

# **Einfluss des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack auf den myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
M. Sc. Anna Roslan  
aus Balingen

Tübingen  
2022

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	28.02.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Robert Lukowski
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Steffen Just

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der akute Myokardinfarkt	1
1.1.1 Entstehung und Einteilung des akuten Myokardinfarkts.....	1
1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts .....	2
1.1.3 Therapie eines akuten Myokardinfarkts .....	6
1.2 Ischämie und Reperfusion (I/R)	7
1.2.1 Der myokardiale I/R-Schaden.....	8
1.2.2 Kardioprotektive Strategien zur Reduktion des kardialen I/R-Schadens.....	9
1.3 K <sup>+</sup> -Dynamik am Herzen	15
1.3.1 Plasmamembranständige K <sup>+</sup> -Kanäle .....	17
1.3.2 Mitochondriale K <sup>+</sup> -Kanäle .....	20
1.4 Na <sup>+</sup> -sensitive K <sup>+</sup> -Kanäle (K <sub>Na</sub> )	22
1.4.1 Identifikation der K <sub>Na</sub> -Kanäle.....	22
1.4.2 Charakterisierung der K <sub>Na</sub> -Kanäle Slack und Slick.....	24
1.4.3 Physiologische/pathophysiologische Bedeutung von Slack .....	27
1.4.4 Mögliche Relevanz von Slack bei hypoxischen/ischämischen Prozessen am Herzen.....	30
1.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit	32
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1 Allgemeine Materialien	34
2.1.1 Laborgeräte .....	34
2.1.2 Software .....	35
2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	36
2.2 Tiermodelle	37
2.2.1 Tierhaltung .....	37
2.2.2 Transgene Mauslinien .....	37
2.3 Genotypisierung	38
2.3.1 Materialien und Substanzen .....	38
2.3.2 Primer zur Genotypisierung.....	39
2.3.3 Puffer und Lösungen .....	39

2.3.4	Ohrmarkierung und Probengewinnung zur Genotypisierung .....	39
2.3.5	DNA-Isolierung .....	40
2.3.6	Polymerasekettenreaktion und DNA-Amplifikation .....	40
2.3.7	Detektion der DNA-Fragmente.....	41
2.4	<i>In vivo</i> Modelle .....	42
2.4.1	Materialien und Substanzen .....	42
2.4.2	Puffer und Lösungen .....	44
2.4.3	Pharmakologische Substanzen.....	44
2.4.4	<i>In situ</i> Modell des akuten Myokardinfarkts .....	44
2.4.5	Chronisches Modell des Myokardinfarkts.....	52
2.4.6	Murine Echokardiographie .....	55
2.4.7	Telemetrische Blutdruckmessung .....	59
2.5	Gewinnung von murinen Kardiomyozyten und Gewebe .....	61
2.5.1	Materialien und Substanzen .....	61
2.5.2	Puffer und Lösungen .....	61
2.5.3	Isolation von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	62
2.5.4	Isolation von Gewebe .....	64
2.6	DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Gewebe .....	64
2.7	Kultivierung adulter Kardiomyozyten .....	65
2.7.1	Materialien und Substanzen .....	65
2.7.2	Puffer und Lösungen .....	65
2.7.3	Hypoxie und Reoxygenierung <i>in vitro</i> .....	66
2.7.4	Virale Transduktion von Kardiomyozyten für $[K^+]_i$ -Messungen .....	67
2.8	HEK293-Zellkultur .....	68
2.8.1	Materialien und Substanzen .....	68
2.8.2	Puffer und Lösungen .....	68
2.8.3	Kultivierung und Passagierung der HEK293-Zelllinien .....	69
2.8.4	Kryokonservierung und Auftauprozess .....	69
2.8.5	Transfektion der HEK293-Zelllinien für $[K^+]_i$ -Messungen.....	70
2.9	FRET-basierte Analytik .....	71
2.9.1	Materialien und Substanzen .....	72
2.9.2	Pharmakologische Modulatoren.....	72
2.9.3	Puffer und Lösungen .....	73
2.9.4	$[K^+]_{ex}$ Messungen an Kardiomyozyten.....	73
2.9.5	$[K^+]_i$ Messungen an Kardiomyozyten.....	74
2.9.6	$[K^+]_i$ Messungen an HEK293 und HEK293-hKCNT1 Zellen.....	75
2.10	RNA-Analytik .....	76
2.10.1	Materialien und Substanzen .....	76

2.10.2	Lösungen und Primer .....	76
2.10.3	RNA-Gewinnung aus Kardiomyozyten und Fibroblasten .....	77
2.10.4	RNA-Isolation aus murinem Herzgewebe .....	77
2.10.5	cDNA-Synthese .....	78
2.10.6	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) .....	79
2.11	Proteinanalytik .....	80
2.11.1	Materialien und Substanzen .....	80
2.11.2	Puffer und Lösungen .....	81
2.11.3	Antikörper für die Western Blot-Analyse .....	83
2.11.4	Protein-Gewinnung aus kardialen Zellen und Herzgewebe .....	83
2.11.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	84
2.11.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	84
2.11.7	<i>Semi-Dry</i> Western Blot-Methode .....	86
2.11.8	Proteindetektion .....	87
2.12	Histologische Untersuchungen .....	87
2.12.1	Materialien und Substanzen .....	87
2.12.2	Puffer und Lösungen .....	88
2.12.3	Organpräparation und Anfertigung von Kryoschnitten .....	89
2.12.4	Picro-Sirius-Rot-Färbung zum Nachweis von Fibrose .....	89
2.12.5	Anfertigung von Zellenpräparaten für Fluoreszenz-basierte Analysen .....	90
2.13	Statistik .....	91
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>92</b>
3.1	Expressionsnachweis von Slack in murinen und humanen Herzen .....	92
3.2	Funktionale Analyse von Slack-Kanälen in murinen Kardiomyozyten .....	93
3.2.1	Elektrophysiologische Untersuchungen von Na <sup>+</sup> -sensitiven K <sup>+</sup> -Strömen in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten .....	93
3.2.2	FRET-basierte [K <sup>+</sup> ] <sub>ex</sub> -Untersuchungen in Kardiomyozyten .....	95
3.2.3	FRET-basierte [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Untersuchungen in Kardiomyozyten .....	96
3.3	Charakterisierung des Slack-Kanals in HEK293-hKCNT1-Zellen .....	98
3.3.1	Expressionsnachweis von Slack in HEK293-hKCNT1-Zellen .....	98
3.3.2	FRET-basierte [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Messungen in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen .....	99
3.3.3	Regulation des Plasmamembranpotentials in HEK293-hKCNT1 <i>versus</i> HEK293-Kontrollzellen .....	103
3.4	Einfluss des Slack-Kanals auf das myozytäre Überleben bei Hypoxie und Reoxygenierung <i>in vitro</i> .....	104
3.5	Bestimmung der Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt in globalen Slack KO-Mäusen .....	105

3.6	Einfluss verschiedener Konditionierungsstrategien auf den kardialen I/R-Schaden in globalen Slack KO-Mäusen	107
3.6.1	Volatile Präkonditionierung in globalen Slack KO-Mäusen.....	107
3.6.2	Ischämische Postkonditionierung in globalen Slack KO-Mäusen .....	108
3.6.3	Quantitative Proteinanalyse verschiedener Mediatoren bei I/R <i>in vivo</i> .....	109
3.7	Generierung einer Kardiomyozyten-spezifischen Slack KO-Mutante unter Einsatz der $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase	112
3.8	Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps der CM Slack KO-Mauslinie	113
3.8.1	Validierung der Herzfunktion mittels konventioneller M-Mode-Echokardiographie.....	113
3.8.2	Darstellung der physiologischen Herzfunktion mittels ST-basierter Echokardiographie.....	114
3.8.3	Telemetrische Blutdruckmessung in CM Slack KO-Mäusen.....	116
3.9	Auswirkung der kardiomyozytären Slack-Deletion auf den I/R-Schaden <i>in vivo</i>	118
3.10	Modulation der Infarktgröße durch mechanische Konditionierung in CM Slack KO-Mäusen	119
3.11	Pharmakologische Modulation des GC/cGMP/cGKI Signalwegs mittels Cinaciguat	121
3.12	Modulation des iPre-vermittelten Herzschutzes durch Administration des mitoK <sub>ATP</sub> -Inhibitors 5-Hydroxy-Decanoate (5-HD)	123
3.13	Auswirkungen der kardiomyozytären Slack-Deletion auf die Langzeitfolgen nach Myokardinfarkt	125
3.13.1	Morphologische Veränderung der Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	125
3.13.2	Fibrotische Veränderung der Herzstruktur nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	126
3.13.3	M-Mode basierte Analyse der Herzfunktion nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	127
3.13.4	STE-basierte Analyse der Herzfunktion nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	128
3.13.5	STE-basierte Segmentanalyse zur Erfassung regionaler Dysfunktionen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	130
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>137</b>
4.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung des Slack-Kanals im Kardiomyozyt	137
4.1.1	Expression von Slack im Herzen .....	137
4.1.2	Funktionale Charakterisierung von Slack im Kardiomyozyt.....	138
4.1.3	Slack moduliert die K <sup>+</sup> -Dynamik im Kardiomyozyt.....	140
4.2	Verwendung der HEK293-hKCNT1-Zelllinie als Surrogatsystem zur Untersuchung des Slack-Kanals	142
4.2.1	Die Überexpression von Slack in HEK293-hKCNT1-Zellen moduliert die physiologische K <sup>+</sup> -Homöostase .....	142
4.2.2	Pharmakologische Aktivierung von Slack in HEK293-hKCNT1 .....	144
4.3	Pathophysiologische Funktion von Slack bei Ischämie/Hypoxie	146
4.3.1	Erhöhte Zelltoderate in Slack-defizienten Kardiomyozyten bei Hypoxie und Reoxygenierung <i>in vitro</i> .....	146

4.3.2	Erhöhte Vulnerabilität in globalen Slack KO-Mäusen nach Ischämie und Reperfusion <i>in vivo</i> .....	147
4.3.3	Identifikation von Slack als Komponente kardioprotektiver Strategien zur Reduktion des I/R-Schadens .....	149
4.4	Der kardiomyozytäre Slack-Kanal ist verantwortlich für das Ausmaß der I/R-Schädigung am Myokard	150
4.4.1	$\alpha$ MHC-Cre-vermittelte DNA-Rekombination von Slack in Kardiomyozyten ...	150
4.4.2	Die kardiomyozytäre Deletion des Slack-Kanals ist ursächlich für den kardiovaskulären Phänotyp bei I/R <i>in vivo</i> .....	151
4.4.3	Die durch mechanische Konditionierung vermittelte Protektion in CM Slack CTR-Tieren steht im Zusammenhang mit mitoK <sub>ATP</sub> .....	154
4.5	Das <i>remodeling</i> der I/R <sub>4Wochen</sub> -geschädigten Herzen ist unabhängig der Slack-Expression	157
4.6	Der kardiomyozytäre Slack-Kanal fördert den Erhalt der linksventrikulären Deformationskapazität nach Myokardinfarkt	159
4.7	Limitationen und Ausblick auf zukünftige Experimente	162
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>164</b>
<b>6</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>167</b>
6.1	Kardiale Slick mRNA-Expressionsanalyse	167
6.2	Charakterisierung und Funktionsanalyse des rekombinanten Sensors GEPII 1.0	167
6.3	Zytoplasmatische Expression des Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 durch Transfektion von HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen	168
6.4	Untersuchungen zur Funktionalität des K <sup>+</sup> -Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen	169
6.5	Slack-unabhängige Modulation der Viabilität durch Niclosamid	170
6.6	Das Membranpotential definiert sich aus den Ionen-individuellen Nernstpotentialen der Zelle	170
6.7	Adaptive Prozesse im mitochondrialen Ionenhaushalt infolge der Slack-Expression in HEK293-hKCNT1	171
6.8	Slick KO-Mäuse zeigen eine normale Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt	173
6.9	Die globale Deletion des Slack-Kanals hat keinen Einfluss auf die physiologische, linksventrikuläre Herzfunktion	174
6.10	Die heterozygote Expression des Slack-Kanals hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße	175
6.11	Darstellung der fibrotischen Veränderung nach I/R <sub>4Wochen</sub> mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung	175
6.11.1	Fibroseentwicklung in CM Slack CTR-Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	176
6.11.2	Fibroseentwicklung in CM Slack KO-Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	177
6.12	Repräsentative Darstellung der fibrotischen Veränderung nach I/R <sub>4Wochen</sub> mittels Masson Trichrom-Färbung	178

6.13	Fibroseentwicklung nach zeitlicher Modulation von Ischämie und Reperfusion im chronischen Infarktmodell	178
6.14	Tabellarische Gegenüberstellung der echokardiographisch erhobenen Daten in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen	179
6.15	STE-basierte, radiale Betrachtung der Herzdynamik	180
6.15.1	Exemplarische Darstellung der longitudinalen Verformungsrate von gesunden und post-I/R-Herzen.....	180
6.15.2	Exemplarische Darstellung der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit von gesunden und post-I/R-Herzen .....	181
6.15.3	Exemplarische Darstellung der radialen Verformung von gesunden und post-I/R-Herzen .....	182
6.15.4	Exemplarische Darstellung der radialen Verformungsrate von gesunden und post-I/R-Herzen .....	183
6.15.5	Exemplarische Darstellung der radialen Verformungsgeschwindigkeit von gesunden und post-I/R-Herzen.....	184
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>185</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>204</b>
8.1	Publikationen	204
8.2	Kongressbeiträge	205

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Zelluläre Prozesse in der ischämischen Phase eines MI .....	4
Abb. 1.2	Postischämische Prozesse am Herzen .....	6
Abb. 1.3	Schematische Darstellung wesentlicher Signalmoleküle bei ischämischer Präkonditionierung.....	12
Abb. 1.4	Ionenverteilung in der erregbaren Zelle .....	16
Abb. 1.5	K <sup>+</sup> -Dynamik zur Generierung eines Aktionspotentials.....	19
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Untereinheit von Slack .....	26
Abb. 2.1	Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR mit anschließender Gelelektrophorese.....	42
Abb. 2.2	Zeitlicher Verlauf des akuten MI-Modells.....	45
Abb. 2.3	Schematische Darstellung der Doppelfärbetechnik eines I/R-konditionierten Herzens zur planimetrischen Infarktgrößenbestimmung.....	48
Abb. 2.4	Operationsschema für die volatile Präkonditionierung im akuten MI-Modell .....	49
Abb. 2.5	Operationsschemata für die mechanische Prä- und Postkonditionierung im akuten MI-Modell.....	50
Abb. 2.6	Operationsschemata für die Applikation der pharmakologischen Substanzen Cinaciguat und 5-Hydroxydecanoat im akuten MI-Modell .....	51
Abb. 2.7	Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion mittels konventioneller M-Mode Auswertung .....	57
Abb. 2.8	STE-basierte globale Funktionsanalyse des linken Ventrikels .....	58
Abb. 2.9	STE-basierte regionale Funktionsanalyse des linken Ventrikels.....	59
Abb. 2.10	Das FRET-Prinzip .....	71
Abb. 2.11	Positionierung der <i>regions of interest</i> (ROIs) für die [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Messung am Kardiomyozyt .....	75
Abb. 3.1	Expressionsanalyse von Slack-Kanälen in murinem und humanem Herzgewebe bzw. Herzmuskelzellen.....	93
Abb. 3.2	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionalität des Slack-Kanals in murinen Kardiomyozyten .....	94
Abb. 3.3	FRET-basierte Untersuchungen zur Erfassung der [K <sup>+</sup> ] <sub>ex</sub> -Dynamik von WT- und Slack KO-Kardiomyozyten .....	95
Abb. 3.4	FRET-basierte Untersuchungen zur Erfassung der [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Dynamik von WT- und Slack KO-Kardiomyozyten .....	97
Abb. 3.5	Expressionsanalyse von Slack in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen.....	98
Abb. 3.6	FRET-basierte Analyse zur Erfassung des absoluten K <sup>+</sup> -Gehalts in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen .....	100
Abb. 3.7	Untersuchung der [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Dynamik nach pharmakologischer Modulation des [Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Gehalts der Zellen mittels des Na <sup>+</sup> -Ionophors Monensin .....	101
Abb. 3.8	Untersuchung der [K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Dynamik nach pharmakologischer Modulation der Kanal-Aktivität mittels Slack-Aktivator Niclosamid .....	102

Abb. 3.9	Membranpotentialmessungen in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen mittels DIBAC4(3).....	104
Abb. 3.10	Untersuchungen zur Viabilität in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten mittels Trypanblau-Färbung nach Hypoxie und Reoxygenierung <i>in vitro</i> ...	105
Abb. 3.11	Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in WT- und globalen Slack KO-Herzen .....	106
Abb. 3.12	Erfassung des kardioprotektiven Effekts nach volatiler Präkonditionierung in WT- und Slack KO-Herzen .....	108
Abb. 3.13	Infarktgrößenbestimmung nach ischämischer Postkonditionierung in WT- und globalen Slack KO-Herzen.....	109
Abb. 3.14	Expressions- und Aktivitätsanalyse der RISK-Mediatoren Akt und ERK1/2 sowie PKC $\epsilon$ nach Ischämie und Reperfusion in WT- und Slack KO-Herzen .....	111
Abb. 3.15	Genomische PCR-Analyse zur Bestätigung der Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des Slack-Kanals in $\alpha$ MHC-Cre <sup>Tg/+</sup> Slack <sup>fl/+</sup> -Mäusen .....	112
Abb. 3.16	Konventionell echokardiographische Untersuchung der linksventrikulären Herzfunktion von Kardiomyozyten-spezifischen Slack Mutanten unter Basalbedingungen .....	114
Abb. 3.17	STE-basierte Analyse der linksventrikulären Funktion der Herzen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen.....	116
Abb. 3.18	Telemetrie-basierte Untersuchung der physiologischen Blutdruckregulation, der Herzrate und der Aktivität.....	117
Abb. 3.19	Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in Kardiomyozyten-spezifischen Slack-Mutanten.....	119
Abb. 3.20	Erfassung der Infarktgröße nach ischämischer Prä- und Postkonditionierung in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen .....	121
Abb. 3.21	Untersuchung der Infarktgröße nach pharmakologischer Aktivierung des GC/cGMP/cGKI-Signalwegs mittels Cinaciguat .....	122
Abb. 3.22	Erfassung des kardialen Schadens nach ischämischer Präkonditionierung unter Inhibition der mitoK <sub>ATP</sub> -Funktion durch 5-Hydroxy-Decanoate.....	124
Abb. 3.23	Makroskopische Bewertung der post-MI Infarktareale und Herzgewichte nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	126
Abb. 3.24	Picro-Sirius-Rot-Färbung zur Untersuchung von kardialer Fibrose nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	127
Abb. 3.25	Konventionelle M-Mode-Echokardiographie zur Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	128
Abb. 3.26	ST-basierte Echokardiographie zur Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	130
Abb. 3.27	Longitudinale Verformung des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	132

Abb. 3.28	Statistische Erfassung der regionalen Deformation in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	134
Abb. 4.1	Das elektrochemische Gleichgewicht einer Zelle.....	143
Abb. 4.2	Gegenüberstellung der Myokardschädigung in globalen und konditionalen Slack-Mutanten.....	153
Abb. 5.1	Hypothese der kardioprotektiven Aktion des Slack-Kanals bei Ischämie/Hypoxie.....	166
Abb. 6.1	mRNA-Expressionsanalyse des Slick-Kanals im Herzen und kardialen Zellen.....	167
Abb. 6.2	Erfassung der K <sup>+</sup> -Sensitivität des rekombinanten Sensors GEPII 1.0.....	167
Abb. 6.3	Ermittlung der Transfektionseffizienz in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen.....	168
Abb. 6.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung des Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen.....	169
Abb. 6.5	Untersuchungen zur Viabilität in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen nach Stimulation mit Niclosamid.....	170
Abb. 6.6	Untersuchung des [K <sup>+</sup> ] <sub>mito</sub> -Haushalts und des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_{mito}$ in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen.....	172
Abb. 6.7	Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in WT- und globalen Slick KO-Herzen.....	173
Abb. 6.8	Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion via konventioneller M-Mode-Echokardiographie in WT- und globalen Slack KO-Mäusen.....	174
Abb. 6.9	Heterozygote Slack-Mäuse zeigen eine normale Infarktgröße nach akutem MI <i>in vivo</i> .....	175
Abb. 6.10	Picro-Sirius-Rot-Färbung der CM Slack CTR-Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	176
Abb. 6.11	Picro-Sirius-Rot-Färbung der CM Slack KO-Herzen nach I/R <sub>4Wochen</sub> .....	177
Abb. 6.12	Darstellung fibrotischer Areale in I/R <sub>4Wochen</sub> -geschädigten Herzen mittels Masson Trichrom-Färbung.....	178
Abb. 6.13	Picro-Sirius-Rot-Färbung von Kontrollherzen nach Anpassung der Zeitfenster von Ischämie und Reperfusion im chronischen Infarktmodell <i>in vivo</i> .....	178
Abb. 6.14	Longitudinale Verformungsrate des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	180
Abb. 6.15	Longitudinale Verformungsgeschwindigkeit des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	181
Abb. 6.16	Radiale Verformung des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	182
Abb. 6.17	Radiale Verformungsrate des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	183
Abb. 6.18	Radiale Verformungsgeschwindigkeit des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen.....	184

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	K <sup>+</sup> -Membranströme am Herzen .....	18
Tabelle 1.2	Elektrophysiologische Eigenschaften von Slack und Slick nach Bhattacharjee et al. 2003.....	24
Tabelle 2.1	Temperaturprotokoll der Genotypisierungs-PCR .....	41
Tabelle 2.2	Pipettierschema zur DNA-Amplifikation .....	41
Tabelle 2.3	Temperaturprotokoll der cDNA .....	78
Tabelle 2.4	Temperaturprotokoll der qRT-PCR .....	79

## Formelverzeichnis

Formel 2.1	Berechnung der linksventrikulären Verkürzungsfraction .....	55
Formel 2.2	Berechnung der linksventrikulären Auswurffraction .....	55
Formel 2.3	Berechnung des benötigten Volumens an Viruslast zur viralen Transduktion adulter Kardiomyozyten .....	67
Formel 2.4	Berechnung der relativen mRNA-Expression nach Durchführung der qRT-PCR.....	80
Formel 3.1	Berechnung des absoluten $K^+$ -Gehalts.....	99
Formel 6.1	Die Nernstgleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotentials eines Ions.....	170

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	<i>Alpha-smooth muscle actin</i>	cGMP	Zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat
AA	Anterior Apex	CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
AAR	<i>Area at risk</i>	CIN	Cinaciguat
AB	Anterior Basis	Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
AC	Anästhetische Konditionierung	[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Cl <sup>-</sup> -Konz.
ACh	Acetylcholin	CM	Kardiomyozyt
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>	cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
ACS	Akutes Koronarsyndrom	CO	Herzzeitvolumen ( <i>cardiac output</i> )
ADNFLE	<i>Autosomal dominant nocturnal front lobe epilepsy</i>	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ADP	Adenosindiphosphat	cpm	<i>Counts per minute</i>
AfCS	<i>Alliance for cellular signalling</i>	Cre	<i>Cyclization recombination</i>
AHP	<i>Afterhyperpolarization</i>	cRNA	Kodierender RNA-Strang
Akt	Proteinkinase B	CSQ	Calsequestrin
AM	Anterior Mitte	C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure	CTX	Charybdotoxin
ANAR	<i>Area not at risk</i>	Da	Dalton
AP	Aktionspotential	DAG	Diacylglycerol
APC	Anästhetische Präkonditionierung	DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
APD	Aktionspotentialsdauer	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
APOST	Anästhetische Postkonditionierung	DEPC	Diethyldicarbonat/Diethylpyrocarbonat
ASS	Acetylsalicylsäure	DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
AT1R	Angiotensin II-Rezeptor	dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat	DiBAC4(3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)- Trimethine Oxonol
ATPase	Adenosintriphosphatase	DIV	<i>Days in vitro</i>
Ba <sup>2+</sup>	Barium-Ion	DKO	Doppel- <i>Knockout</i>
B-Mode	<i>Brightness mode</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>	dNTPs	Desoxynukleotid- triphosphate
BK	<i>Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel</i>	DRG	<i>Dorsal root ganglion</i>
bp	Basenpaar	dsDNA	Doppelstrang-DNA
BSA	Bovines Rinderalbumin	DTT	Dithiothreitol
bzgl.	Bezüglich	E2	17 $\beta$ -Estradiol
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Dosis/ Konzentration
C-Terminus	Carboxy-Terminus	ECM	Extrazellulärmatrix
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion	EDD	Enddiastolischer Durchmesser
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konz.	EDLVM	Enddiastolische links- ventrikuläre Masse
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Ca <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanal	EDV	Enddiastolisches Volumen
cDNA	<i>Copy DNA</i>	EEG	Elektroenzephalopathie
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>	EF	Auswurfraction ( <i>ejection fraction</i> )
CGCs	Zerebelläre Granularzellen	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I		

EIMFS	<i>Epilepsy of infancy with migrating focal seizures</i>	HCN	<i>Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>
EKG	Elektrokardiogramm		
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	HERG	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily H member</i>
EOEE	<i>Early onset epileptic encephalopathy</i>	HF	Herzfrequenz
ER	Östrogen-Rezeptor	hiPS	Humane pluripotente Stammzellen
ERK	<i>p42/p44 extracellular signal-regulated kinase</i>	HI	Herzinsuffizienz
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen	hKCNT1	Humanes KCNT1
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>	HO·	Hydroxyl-Radikal
ESD	Endsystolischer Durchmesser	HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
ESLVM	Endsystolische linksventrikuläre Masse	hSlack	Humaner Slack-Kanal
EST	<i>Expressed sequence tags</i>	Hz	Hertz
ESV	Endsystolisches Volumen	i.p.	Intraperitoneal
ET-1	Endothelin 1	I/R	Ischämie und Reperfusion
ETC	Elektronentransportkette	IbTX	Iberitoxin
EU	Europäische Union	ICM	ischämische Kardio-myopathie
E <sub>x</sub>	Nernst-Potential	I <sub>f</sub>	Siehe HCN
F	Vorwärtsprimer ( <i>forward</i> )	IHC	Immunhistochemie
ff.	Folgende	I <sub>K1</sub>	Siehe Kir
FMRP	<i>Fragile X mental retardation 1 protein</i>	I <sub>KACH</sub>	Siehe GIRK
FP	Fluoreszierende Proteine	I <sub>KATP</sub>	Siehe K <sub>ATP</sub>
FRET	Förster Resonanzenergietransfer	I <sub>KCa</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Strom
FS	Verkürzungsfraction ( <i>fractional shortening</i> )	I <sub>KNa</sub>	Na <sup>+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Strom
FXS	<i>Fragile X syndrome</i>	I <sub>KP</sub>	Siehe K <sub>2P</sub>
G-Protein	Guanosintriphosphatbindendes Protein	I <sub>Kr</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, rapid</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	I <sub>Ks</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, slow</i>
GC	Lösliche Guanylylzyklase	I <sub>Kur</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, ultra rapid</i>
GEPII	<i>genetically encoded K<sup>+</sup> ion indicator</i>	IL-1β	Interleukin 1β
GIRK	<i>G-protein coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel</i>	IL-6	Interleukin 6
GLS	Globale longitudinale Dehnung ( <i>global longitudinal strain</i> )	IMM	Innere Mitochondrien-membran
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	I <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -Strom
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>	INSDC	<i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
GTP	Guanosintriphosphat	IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )	IP <sub>3</sub> R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion, Proton	iPost	Ischämische Postkonditionierung
[H <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre H <sup>+</sup> -Konz	iPre	Ischämische Präkonditionierung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	IRI	<i>Ischemia and reperfusion induced injury</i>
H/R	Hypoxie/Reoxygenierung	I <sub>to,f</sub>	<i>K<sup>+</sup> transient outward, fast</i>
		I <sub>to,s</sub>	<i>K<sup>+</sup> transient outward, slow</i>
		IVS	Interventrikulärseptum
		I <sub>x</sub>	Ionenstrom
		JAK/STAT3	<i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3</i>
		K <sup>+</sup>	Kalium-Ion

[K <sup>+</sup> ] <sub>ex</sub>	Extrazelluläre K <sup>+</sup> -Konz.	mitoBK	Mitochondrialer BK-Kanal
[K <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre K <sup>+</sup> -Konz.	mitoK <sub>ATP</sub>	Mitochondrialer ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>2P</sub>	<i>Two pore-domain</i> K <sup>+</sup> -Kanal		
K <sub>ATP</sub>	ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal	ml	Milliliter
kb	Kilobasen	m <sub>LV</sub>	linksventrikuläre Masse
Kbp	K <sup>+</sup> -bindende Protein	mm	Millimeter
KCNMA1	<i>Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1</i>	mM	Millimolar
		mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
KCNN2/3	<i>Small conductance calcium-activated potassium channel protein 2/3</i>	mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
		MMPs	Matrixmetalloproteinasen
		MMPSI	<i>Malignant migrating partial seizures in infancy</i>
KCNT1/2	<i>Potassium channel subfamily T member 1/2</i>	MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
KCNU1	<i>Potassium channel subfamily U member 1</i>	mPTP	Mitochondriale Permeabilität - Transitions-pore
Kg	Kilogramm	mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
KG	Körpergewicht	ms	Millisekunde
KHK	Koronare Herzkrankheit	MI	Myokardinfarkt
Kir	<i>K<sup>+</sup> inward rectifier</i>	mV	Millivolt
K <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal	mW	Milliwatt
KO	<i>Knockout</i>	N <sub>2</sub>	Stickstoff
K <sub>v</sub>	<i>Voltage-gated K<sup>+</sup> channel</i>	N-Terminus	Amino-Terminus
KVLQT1	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1</i>	Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
		[Na <sup>+</sup> ] <sub>ex</sub>	Extrazelluläre Na <sup>+</sup> -Konz.
		[Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Na <sup>+</sup> -Konz
l	Liter	Na <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Na <sup>+</sup> -Kanal
lc	<i>Low charge</i>		
LCA	Linke Koronararterie	NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenin-dinukleotid, oxidierte Form
LDH	Laktatdehydrogenase		
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>	NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid, reduzierte Form
Li <sup>+</sup>	Lithium-Ion	NaOH	Natriumhydroxid
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>	Na <sub>v</sub> 1.1	Spannungsabhängiger Na <sup>+</sup> -Kanal, Typ I (SCN1A)
LVID	Linksventrikulärer Innendurchmesser		
LVPW	Linksventrikuläre Hinterwand	NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
LysM	Lysin-Motiv	NDS	Normaleserum
M	Molar	NES	<i>Nuclear export sequence</i>
M-Mode	<i>Time mode</i>	NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
mA	Milliampere	NFκB	Nuclear factor kappa B
MAC	Minimale alveoläre Konzentration	ng	Nanogramm
mAChR	Muskarinerge Acetylcholinrezeptor	NGS	Normalziegenserum
		NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck	nl	Nanoliter
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	NLR	NOD-like Rezeptor
		nm	Nanometer
mBK	Mitochondrialer BK-Kanal	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
mEq/kg	Milli-Äquivalenz pro kg	NMDAR	NMDA-Rezeptor
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion	NMH	Niedermolekulares Heparin
mGluR1	Metabotroper Glutamatrezeptor 1	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
		NO	Stickstoffmonoxid
miRNA	MicroRNA	NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
min	Minuten	NSTEMI	<i>Non ST-elevation myocardial infarction</i>

O <sub>2</sub>	Sauerstoff	RNS	Reaktive Stickstoffspezies
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion	ROI	<i>Region of interest</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit-Anion	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
OP	Operation	rpm	Umdrehungen pro Minute
oxLDL	Oxidiertes LDL-Protein	RPP	<i>Rate pressure product</i>
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung	rT	Reverse Transkriptase
p	Phospho-	RT	Raumtemperatur
PA	Posterior Apex	RyR	Ryanodin-Rezeptor
PB	Posterior Basis	s	Sekunde
PCI	Perkutane Koronarintervention	sAHP	Langsame Nachhyperpolarisation
PCR	Polymerasekettenreaktion	SBFI	<i>Sodium-binding benzofluran isophthalate</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	SBFI-AM	SBFI-Acetoxymethyl-Este
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase	s.c.	Subkutan
PDZ	<i>Postsynaptic density 95/disc large/zona occludens</i>	SDH	Succinat-Dehydrogenase
PFA	Paraformaldehyd	SDS	Natriumdodecylsulfat
pH	Potential des Wasserstoffs	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Phactr1	<i>Phosphatase and actin regulator 1</i>	SEM	Standardfehler
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat	SERCA	<i>Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	SIRT1	Sirtuin 1
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat	SK	<i>Small conductance of K<sup>+</sup></i>
PKA	Proteinkinase A	Slack	<i>Sequence like a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channel</i>
PKC	Proteinkinase C	Slack-KO	Slack-Knockout, Slack <sup>-/-</sup>
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I	Slack WT	Slack-Wildtyp, Slack <sup>+/+</sup>
PLB	Phospholamban	Slack <sup>+/-</sup>	Heterozygoter Slack-KO
PLC	Phospholipase C	Slick	<i>Sequence like an intermediate conductance K<sup>+</sup>-channel</i>
PM	Posterior Mitte	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	STE	<i>Speckle tracking echocardiography</i>
pmol	Picomol	STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
p.o.	Peroral	SV	Schlagvolumen ( <i>stroke volume</i> )
pO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> -Partialdruck	syn.	Synonym
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>	TAC	Transverse Aortenkonstriktion
pS	Picosiemens	TASK-1	<i>Potassium channel subfamily K member 3</i>
PSD95	<i>Postsynaptic density 95</i>	TEA	Tetraethylammonium
PSLAX	Parasternale lange Achse	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PVDF	Polyvinylidendifluorid	TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR (Real-time quantitative PCR)	TIMPs	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
R	Rückwärtsprimer ( <i>reverse</i> )	Ti <sup>+</sup>	Thallium-Ion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	TLR	Toll-like Rezeptor
Rb <sup>+</sup>	Rubidium-Ion	TMD	Transmembrandomäne
Rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung	TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat
RCK	<i>Regulator of conductance of K<sup>+</sup></i>	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
RISK	<i>Reperfusion injury salvage kinase</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNase	Ribonuklease		

TREK-1	<i>Potassium channel subfamily K member 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	Tyrosinkinase B
TRPA1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1</i>
TSchG	Tierschutzgesetz
TSchVersV	Tierschutzversuchs-verordnung
TTC	2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	Umdrehungen
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VA	Volatiles Anästhetikum
VE	Voll entsalzen
Vol-%	Volumenprozent
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
x	Variable
Zn <sup>2+</sup>	Zink-Ion
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\Delta\Psi$	Plasmamembranpotential
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
%	Prozent
°C	Grad Celcius
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
3K	3 Komponenten
4-AP	4-Aminopyridin
5-HD	5-Hydroxy-Decanoate

# 1 Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems betreffen derzeit ca. 49 Millionen Menschen innerhalb der Europäischen Union (EU) und sind ursächlich für 1,8 Millionen Todesfälle jährlich. Dies entspricht einem Anteil von 37 % aller Todesfälle in der EU und repräsentiert somit die häufigste krankheitsbedingte Todesursache in Europa. Darunter sind ischämische Herzerkrankungen die häufigste Einzelursache mit tödlichem Verlauf. Begünstigt wird deren Entstehung durch verschiedene Risikofaktoren und Vorerkrankungen wie Adipositas, Hyperlipoproteinämie, Hypertonie, Diabetes und Rauchen. Die aktuellen Kosten zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen belaufen sich auf eine Summe von 210 Milliarden € pro Jahr für die europäische Ökonomie (Wilkins et al. 2017).

## 1.1 Der akute Myokardinfarkt

### 1.1.1 Entstehung und Einteilung des akuten Myokardinfarkts

Die koronare Herzkrankheit (KHK) zählt zu den ischämischen Herzerkrankungen und manifestiert sich durch atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien in deren Folge es zu einem akuten Myokardinfarkt (MI) kommen kann (Otsuka et al. 2016). Ausgangspunkt für die Entstehung einer Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion. Durch Schädigung der Endothelzellen findet eine erleichterte Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten statt. Außerdem wird durch die erhöhte Permeabilität von Lipoproteinen die Einlagerung von oxidierten *Low-Density* Lipoproteinen (oxLDL) in der subendothelialen Intima begünstigt (Gargiulo et al. 2016). Zirkulierende Monozyten wandern ein, werden zu Makrophagen transformiert und durch Phagozytose von oxLDL zu Schaumzellen differenziert. Infolge dieser chronischen Umgestaltung der Gefäßwand entsteht ein arteriosklerotischer Plaque, der eine Stenosierung des Gefäßes und eine Minderdurchblutung des Myokards verursacht (stabile Angina Pectoris). Entzündungsprozesse, wie die Aktivierung von Metalloproteasen provozieren den Abbau der bindegewebigen Deckplatte und formen einen instabilen Plaque (instabile Angina pectoris), der bei Ruptur zum Gefäßverschluss (Okklusion) und somit zum akuten Koronarsyndrom (ACS, *acute coronary syndrome*) führt. Diese Komplikation kann einen akuten MI verursachen und ist damit unmittelbar lebensbedrohlich (Moran et al. 2014; Moran et al. 2012). Das ACS beinhaltet neben der instabilen Angina pectoris zwei weitere Formen des akuten MI. Es wird zwischen einem nicht-transmuralem (NSTEMI, *non ST-elevation myocardial infarction*) und einem transmuralen MI (STEMI, *ST-elevation myocardial infarction*) differenziert (Thygesen et al. 2012). Beide Formen resultieren aus einer vorangegangenen Plaqueruptur und Thrombenbildung. Diagnostisch unterscheidet sich ein STEMI von einem NSTEMI im Elektrokardiogramm (EKG) durch ST-Streckenhebung und teilweise veränderter Q-Zacke als Resultat einer Infarzierung der gesamten Herzwand. Ein NSTEMI zeigt keine ST-Streckenhebung, kann im EKG unauffällig sein oder nur geringe Veränderungen zeigen oder ist durch Inversion der T-Welle charakterisiert. Die Infarkt Diagnostik erfasst außerdem die serologischen Nekrosemarker, primär Troponin T und Troponin I, die aufgrund der Myokardschädigung im Blut nachgewiesen werden können. Der

Wert der Marker korreliert dabei mit der Infarktgröße und den ACS-Krankheitsbildern (Thygesen et al. 2007).

Als akute Komplikation infolge eines MI sind Herzrhythmusstörungen, eine Ischämie-bedingte Mitralklappeninsuffizienz oder das akute Pumpversagen des Herzens zu nennen (Bajaj et al. 2015). Im späteren Verlauf kann es innerhalb des infarzierten Areals zur Ausbildung eines Herzwandaneurysmas mit zusätzlicher Embolie- bzw. Rupturgefahr kommen. Durch die fibrotische Narbenbildung und morphologische Anpassung des Myokards ist die chronische Herzinsuffizienz (HI) als weitere Spätkomplikation eines MI hochrelevant (Cahill & Kharbanda 2017; Cosby et al. 1976).

### **1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts**

Der akute MI wird definiert als ischämischer Untergang myokardialen Gewebes, verursacht durch das Auftreten eines plötzlichen Gefäßverschlusses infolge thrombotischer Ereignisse und Plaqueruptur (Frangogiannis 2015; Thygesen et al. 2018). Der Untergang vitaler Kardiomyozyten wird durch verschiedene Zelltodmechanismen ausgelöst. Der kontrollierte Zelltod durch Apoptose, angestoßen durch oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine, trägt zum Gewebeuntergang bei akutem MI bei (Hotchkiss et al. 2009; Wang et al. 2018). Durch die Aktivierung intrinsischer (z. B. Bax) sowie extrinsischer Signalwege (*via* Todesrezeptoren) führen Caspasen- und Proteasen-getriebene intrazelluläre Prozesse zur Autodestruktion geschädigter Kardiomyozyten (Lodrini & Goumans 2021). Im Gegensatz dazu repräsentierte die Nekrose lange Zeit einen vorwiegend passiven, unkontrollierten Prozess, der den Zelluntergang durch Integritätsverluste der Zelle beispielsweise durch das osmotische Anschwellen (Onkosis) und Freisetzen intrazellulärer Bestandteile provoziert (D'Arcy 2019). Mittlerweile ist bekannt, dass auch die Nekrose einem aktivierbaren, kontrollierten Zelltodmechanismus z. B. unter Beteiligung des Mitochondriums unterliegen kann (Del Re et al. 2019). Nekrotische Kardiomyozyten und Fragmente der zerstörten Extrazellulärmatrix (ECM) fördern eine übermäßige Myokardschädigung und stoßen inflammatorische Prozesse am Herzen an. Neben diesen bekannten Formen des Zelltods wurde kürzlich ein weiterer, Caspasen-unabhängiger Zelltodmechanismus beschrieben. Als Nekroptose bezeichnet, entspricht diese Form einer Kombination aus apoptotischen und nekrotischen Prozesseigenschaften, die durch Todesrezeptoren angestoßen ebenfalls an der Gestaltung des myokardialen Schadens beteiligt zu sein scheint (Luedde et al. 2014).

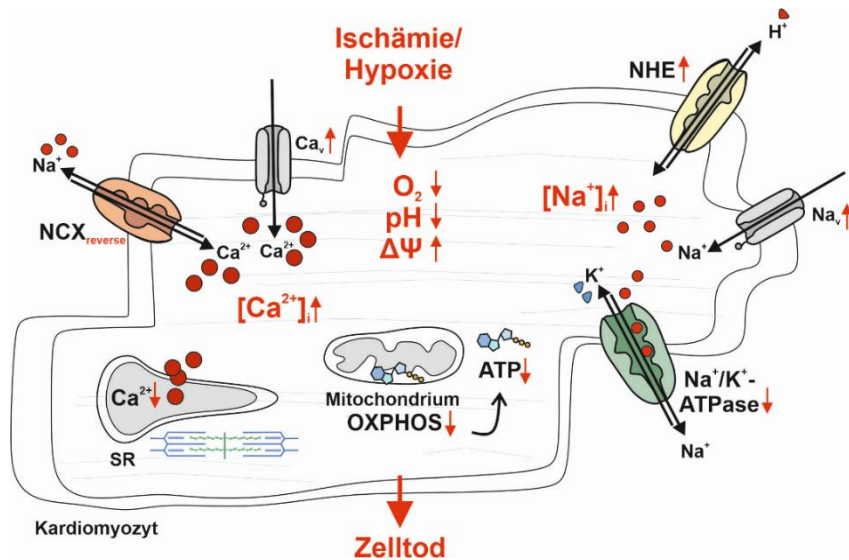
Die Pathophysiologie des MI umfasst verschiedene Signalkaskaden und biochemische Prozesse unter Beteiligung verschiedener kardialer Zelltypen, die nachfolgend im Detail beschrieben werden.

#### **1.1.2.1 Ischämische Phase**

Die Okklusion einer oder mehrerer Koronararterien bedingt die Minderdurchblutung und somit die Unterversorgung des betroffenen myokardialen Gewebes mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Substrat. Daraus resultieren massive biochemische und metabolische Veränderungen im Myokard (Frangogiannis 2015), die in Abb. 1.1 schematisch dargestellt sind.

Der abnehmende  $O_2$ -Partialdruck ( $pO_2$ ) verursacht eine anaerobe Stoffwechsellage in den Infarkt-betroffenen Zellen am Myokard. Durch anaerobe Glykolyse kommt es zur Laktatazidose (Ferdinandy et al. 2007). Zeitgleich entsteht durch den verminderten Abtransport von Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) eine respiratorische Azidose, die zu einer zusätzlichen Abnahme des pH-Werts ( $< 7,0$ ) beiträgt (Ruffin et al. 2008). Um der intrazellulären Azidose infolge der Protonen-Akkumulation ( $[H^+]_i$ ) entgegenzuwirken, wird u. a. der Natrium ( $Na^+$ )/Protonen ( $H^+$ )-Austauscher (NHE) aktiv, der im Gegenzug eine Anreicherung von intrazellulären  $Na^+$ -Ionen ( $[Na^+]_i$ ) provoziert (Karmazyn 1998; Pike et al. 1993).

Außerdem sistiert die oxidative Phosphorylierung bei Ischämie, was die mitochondriale Depolarisation und Adenosintriphosphat (ATP)-Verarmung der Zelle zur Folge hat. Das Bestreben der  $F_1F_0$ ATPase, die unter ischämischen Bedingungen in einem reversen Modus als ATP-Hydrolase das mitochondriale Membranpotential aufrechtzuerhalten versucht, geht mit einer zusätzlichen Depletion des Hauptenergiespeichers ATP einher (Hausenloy & Yellon 2013). Bedingt durch den ATP-Mangel ist zudem die Funktionalität der Plasmamembranständigen Natrium ( $Na^+$ )/Kalium ( $K^+$ )-ATPase stark beeinträchtigt, was maßgeblich zu einer  $[Na^+]_i$ -Anreicherung beiträgt. Der Ausfall der  $Na^+/K^+$ -ATPase führt zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des elektrochemischen Gradienten der Zelle und einer positiven Verschiebung des Membranpotential, d. h. zu weniger polarisierten Zuständen des Sarkolemms (Fuller et al. 2003). Die Membrandepolarisation durch  $[Na^+]_i$ -Zunahme stimuliert spannungsabhängige plasmamembranständige  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $Na_v$ ,  $Ca_v$ ), die das Ionenungleichgewicht weiter verschieben. Ebenso ist die ATP-abhängige Calcium ( $Ca^{2+}$ )-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) beeinträchtigt, sodass der zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Gehalt ( $[Ca^{2+}]_i$ ) massiv ansteigt (del Monte et al. 2004). Dieser pathophysiologische Prozess wird auch als „ $Ca^{2+}$ -*overload*“ bezeichnet und weiter vorangetrieben durch die Aktivität des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers (NCX). Unter ischämischen Bedingungen nimmt der NCX im sogenannten *reverse*-Modus an der Ionenverteilung teil und befördert ebenfalls  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Sarkoplasma (Chen & Li 2012). Neben der  $[Ca^{2+}]_i$ -provozierten Hyperkontraktion und dysregulierten Exzitabilität (Prunier et al. 2008) führt die  $Ca^{2+}$ -Akkumulation im Kardiomyozyt zur Aktivierung Zellstruktur-schädigender Proteasen und Phospholipasen (Ferdinandy et al. 2007; Mani et al. 2009). Die Störung der intrazellulären Ionenhomöostase ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ) geht mit einem osmotischen Ungleichgewicht und Schwellung der Organellen einher und verursacht den Integritätsverlust des Sarkolemms (Garcia-Dorado et al. 2012). Die Gesamtheit der Ischämie-bedingten Prozesse provoziert die irreversible Schädigung der myokardialen Zellen. Das Ausmaß an Zelltod korreliert mit der Lokalisation der Okklusion, der Größe des Ischämie-betroffenen Areal sowie dem absoluten  $O_2$ -Bedarf der betroffenen Zellen (Thygesen et al. 2012).



**Abb. 1.1 Zelluläre Prozesse in der ischämischen Phase eines MI**

Illustration intrazellulärer Prozesse im Kardiomyozyt, die in der ischämischen Phase eines MI den Untergang der Zelle provozieren. Die  $O_2$ -Unterversorgung zwingt die Zelle zu einem anaeroben Energiestoffwechsel, infolgedessen es zur intrazellulären Anreicherung von Laktat, anorganischem Phosphat und  $H^+$ -Ionen kommt. Neben der Senkung des pH-Werts verursacht der anaerobe Zustand einen Ausfall der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und die ATP-Verarmung der Zelle. Die zytotoxische Akkumulation intrazellulärer  $Na^+$ - ( $[Na^+]_i$ ) und  $Ca^{2+}$ -Ionen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) und positive Verschiebung des Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) wird u. a. durch den Funktionsverlust der  $Na^+/K^+$ -ATPase, die gestörte  $Ca^{2+}$ -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) über  $Ca^{2+}$ -Pumpen (nicht gezeigt), die Aktivität des  $Na^+/H^+$ -Austauschers (NHE) und spannungssensitiver  $Na^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $Na_v$ ,  $Ca_v$ ) sowie die Funktion des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers (NCX) in umgekehrter Richtung (reverse mode) verursacht. Zur Erstellung der Illustration wurden Abbildungen von *Servier Medical Art* ([smart.servier.com](http://smart.servier.com)) und *BioRender* ([biorender.com](http://biorender.com)) als Vorlage verwendet.

### 1.1.2.2 Inflammatorische Phase

Die Entzündungsreaktion nach einem akuten MI moduliert maßgeblich die Infarktgröße sowie die pathophysiologische Umgestaltung des linken Ventrikels (*remodeling*), was die Entstehung einer HI begünstigt (Frangogiannis 2014; Ong et al. 2018). Angestoßen wird die inflammatorische Reaktion durch das endogene Bestreben, nekrotische Zellkörper im Infarktareal abzubauen. Zugrunde gehende Kardiomyozyten setzen passiv die intrazellulären Proteine *damage associated molecular patterns* (DAMPs) frei, die sich als Gefahrensignal an *pattern recognition receptors* (PRR) wie z. B. Toll-like Rezeptoren (TLR) oder NOD-like Rezeptoren (NLR) binden und eine Immunantwort auslösen (Timmers et al. 2008; van Hout et al. 2016). Zudem werden kardiale Fibroblasten durch DAMPs aktiviert, die aufgrund ihrer proinflammatorischen Eigenschaften (Aktivierung von Inflammasomen, Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen) am Abbau von Zelltrümmern beteiligt sind (Humeres & Frangogiannis 2019; Shinde & Frangogiannis 2014). Weitere Prozesse sind am Inflammationsgeschehen beteiligt, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (via Endothelzellen) und die Aktivierung der Komplementkaskade des humoralen Immunsystems, die ebenfalls die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (IL-1, IL-6, CCL2, CCL5) anstoßen (Ong et al. 2018). Dies führt letztlich zur Rekrutierung immunkompetenter Zellen, darunter neutrophile Granulozyten, die z. B. proteolytische

Enzyme, ROS oder *neutrophil extracellular traps* (NET) freisetzen oder Monozyten, die nach Infiltration zu Gewebemakrophagen differenzieren. Durch die Beseitigung nekrotischer Zellen/Zellbestandteile in der inflammatorischen postischämischen Phase wird anschließend die Reorganisation (siehe 1.1.2.3) des infarzierten Myokards eingeleitet.

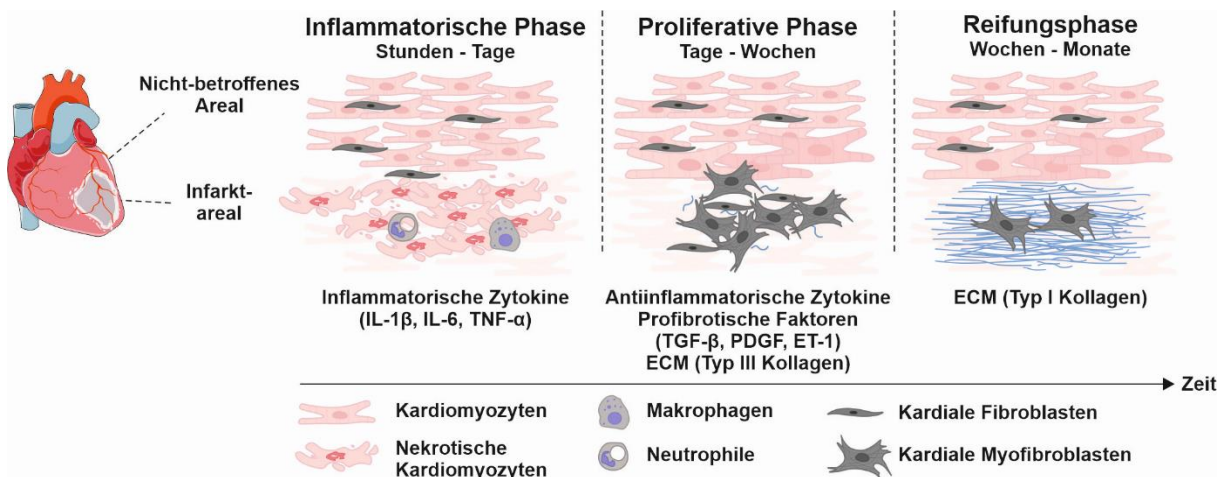
### 1.1.2.3 Proliferative Phase

Ab dem vierten Tag nach akutem MI klingt die inflammatorische Phase (siehe 1.1.2.2) durch inhibitorische Signalkaskaden, Apoptose von neutrophilen Granulozyten und Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10) via Makrophagen ab (Ortega-Gomez et al. 2013). Es beginnt die proliferative Phase zur Wundheilung und Narbenbildung am geschädigten Myokard (Frangogiannis 2015; Venugopal et al. 2022). Die Heilungsprozesse werden durch die Aktivierung von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-exprimierenden Myofibroblasten umgesetzt, die Matrixproteine ins Interstitium des Infarktareals sezernieren. Fibrogene Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, ET-1) und neurohumorale Mediatoren (Angiotensin II, Norepinephrin) stoßen die Phänotyp-Konversion von „ruhenden“ kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten an, die neben der ECM-sezernierenden Bedeutung durch Proliferation und Migration zur Entstehung des Narbengewebes beitragen (Humeres & Frangogiannis 2019; Liu & Desai 2015). Die Architektur und Lokalisation der ECM ist ein dynamischer Prozess unter Beteiligung regulatorischer Systeme wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und spezifische endogene Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (*tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs)) (Lindsey et al. 2016). Durch die Sekretion von Matrixproteinen wird ein Narbengewebe aus Kollagen aufgebaut, das sich aus den Kollagenmolekülen Typ I (85 %) und Typ III (11 %) zusammensetzt. Das Zusammenspiel aus dicken und dünnen Kollagenfasern sichert ein dehnbares und dichtes Narbengewebe unter Erhalt der Elastizität des Matrixnetzwerks (Jugdutt 2003). Durch diese kardiale Umgestaltung (*remodeling*) infolge eines ischämischen Ereignisses wird das Myokard zunächst vor dramatischen Komplikationen wie beispielsweise einer kardialen Ruptur geschützt.

### 1.1.2.4 Reifungsphase

Die finale Phase nach einem akuten MI beschreibt die Reifung des Narbengewebes, bei der es zu einer Stabilisierung der ECM kommt, die Zellinfiltration gestoppt wird und die Reparaturmaßnahmen von Myofibroblasten und Endothelzellen deaktiviert werden (Prabhu & Frangogiannis 2016). Letztlich mündet die Ausreifung der Narbe in ein weitestgehend zellfreies Bindegewebe im ursprünglichen Infarktareal. Dies wird im murinen Modell nach einem Zeitintervall von ca. 14 Tagen erreicht (Dewald et al. 2004). Trotz einer somit abgeschlossenen Wundheilung am Myokard können durch das Verbleiben von geringen Mengen inflammatorisch-aktiver Zellen zusätzliche Umgestaltungsprozesse und biomechanische Veränderungen des Ventrikels auftreten, die in eine erhebliche Kammerdilatation im Bereich des ursprünglichen Infarktareals münden (Mann 2002). Das damit einhergehende lokale Funktionsdefizit wird durch ein progredientes kompensatorisches *remodeling* des Gesamtmyokards (z. B. Vergrößerung der Muskelmasse) beantwortet.

Zusammenfassend führt der Verlust von kontraktionsfähigen Kardiomyozyten infolge eines MI zu einer reduzierten Deformationsfähigkeit, zunehmenden Steifheit und chronischen Überbelastung des Myokards. Dies initiiert Kompensationsmechanismen, die kurzfristig (z. B. durch Freisetzung natriuretischer Peptide) die Pumpleistung des Herzens aufrechterhalten, langfristig (z. B. durch Vergrößerung einzelner Kardiomyozyten, RAAS- und Sympathikus-Aktivierung) aber die Entwicklung einer HI mit chronisch verschlechterter Pumpleistung verursacht (Khalil & McCain 2021; Sutton & Sharpe 2000). Die postischämischen Prozesse und die komplexe Umgestaltung des Myokards unter Beteiligung verschiedener Zelltypen sind in Abb. 1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2 Postischämische Prozesse am Herzen**

Graphische Darstellung der myokardialen Prozesse infolge eines MI. Unmittelbar nach der ischämischen Phase folgt die inflammatorische Phase, die durch den irreversiblen Zelltod von Kardiomyozyten geprägt ist und durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) getriggert wird. Die anschließende proliferative Phase wird durch die Aktivierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten charakterisiert. Mittels antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) wird die Entzündungsreaktion gehemmt und profibrotische Faktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, ET-1) stimulieren die Narbenbildung durch Freisetzung von ECM-Matrixproteinen (Kollagene). Zuletzt führt die Reifungsphase zur Ausreifung des fibrotischen Areals. Durch die dauerhafte Überbelastung des Myokards infolge des MI-bedingten Zelltods funktionaler Kardiomyozyten werden langfristig jedoch auch maladaptive pathophysiologische Prozesse angestoßen wie z.B. die kardiomyozytäre Hypertrophie v.a. im Grenzbereich des Infarktgeschehens oder die chronische Überaktivierung kardialer Fibroblasten. Das kardiale *remodeling* führt über lange Sicht zur Entstehung einer HI. Das Schema wurde modifiziert nach (Khalil & McCain 2021) und Abbildungsfiguren wurden von BioRender ([biorender.com](https://www.biorender.com)) als Vorlage verwendet. ECM: Extrazellulärmatrix, ET-1: Endothelin 1, IL-1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$ , IL-6: Interleukin 6, PDGF: *platelet-derived growth factor*, TGF- $\beta$ : *transforming growth factor*  $\beta$ , TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ .

### 1.1.3 Therapie eines akuten Myokardinfarkts

Die Therapie eines akuten MI richtet sich nach den Empfehlungen der *European Society of Cardiology* (ESC), basierend auf der gegenwärtigen wissenschaftlichen Evidenz (Hamm et al. 2009), herausgegeben als Leitlinie von der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK). Diese sieht vor, dass die invasiv-therapeutischen Maßnahmen in Abhängigkeit des ST-Streckenverlaufs des vorliegenden ACS (STEMI vs. NSTEMI) gewählt werden. Im Falle eines STEMI ist ein sofortiger angioplastischer Eingriff zur schnellen und

vollständigen Revaskularisierung mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) indiziert. Alternativ sind Bypass-Operationen oder die Durchführung einer Fibrinolyse (i.d.R. unter Verwendung von Fibrinolytika der 2. Generation Alteplase, Reteplase, Tenecteplase) anwendbar. Bei NSTEMI-Patienten erfolgt zunächst eine Risikostratifizierung bzgl. eines invasiven Vorgehens (Koronarangiographie) anhand der gemessenen Troponin-Werte (Thygesen et al. 2010). Periprozedural wird in beiden Fällen eine antithrombotische Therapie mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Acetylsalicylsäure (ASS), einem (ADP-)P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonist (Prasugrel, Ticagrelor, Clopidogrel) und einem Heparin (Unfraktioniertes Heparin (UFH), Enoxaparin (NMH)) bzw. Hirudin (Bivalirudin) eingeleitet. Des Weiteren empfiehlt die Leitlinie den Einsatz des Stickstoffmonoxid (NO)-Donators Glyceroltrinitrat zur Gefäßdilatation. Die antianginöse Therapie wird, unter bestimmten Voraussetzungen (insbesondere bei Hypertonie und Tachykardie), durch die Gabe eines  $\beta$ -Blockers (Propranolol, Metoprolol) ergänzt, der durch die Abschirmung sympathisch-adrenerger Einflüsse eine Senkung des myokardialen O<sub>2</sub>-Verbrauchs bewirkt. Um das Leitsymptom des ACS, den akuten Thoraxschmerz, zu therapieren, wird das Opiat Morphin appliziert. Zur Anxiolyse erhalten die Patienten das Benzodiazepin und GABA-A-Rezeptor-Antagonist Diazepam. Postprozedural und sekundärprophylaktisch wird neben einer selbstverantwortlichen Lebensstiloptimierung eine umfangreiche antithrombozytäre (ASS  $\pm$  Antikoagulans) und antianginöse Therapie (Kurzzeitnitrat +  $\beta$ -Blocker) sowie die Zugabe eines Statins und *angiotensin-converting enzyme* (ACE)-Hemmers (bei ggf. zutreffender Co-Morbidität) angeordnet.

## 1.2 Ischämie und Reperfusion (I/R)

Zur Untersuchung der Pathophysiologie eines akuten MI wird in der präklinischen Forschung im Wesentlichen zwischen zwei *in vivo* Infarktmodellen, dem permanenten Infarkt und dem temporären Infarkt, unterschieden (Ischämie und Reperfusion) (De Villiers & Riley 2020). Ersteres wird durch die irreversible Okklusion der linken Koronararterie (LCA) hervorgerufen. Das permanente Infarktmodell provoziert eine ausgeprägte Infarzierung des Risikoareals, eine signifikante Zunahme an apoptotischen Zellen und die Entstehung einer großflächigen Fibrose (Gao et al. 2000). Hingegen wird bei einem temporären Infarkt die LCA lediglich für einen definierten Zeitraum, gefolgt von der Wiedereröffnung und Revaskularisierung des Gefäßes, okkludiert (Michael et al. 1995). Das *in vivo* Modell der Ischämie und Reperfusion (I/R) ist dem klinischen Bild eines revaskularisierten MI nach intensivmedizinischer Intervention gleichzusetzen. In Abhängigkeit der Spezies variiert die Dauer der verschiedenen Phasen (siehe 1.1.2) eines akuten MI. Beispielsweise ist im murinen Modell aufgrund der hohen Stoffwechselrate der Maus mit deutlichen Nekrosen ab einer Ischämiephase von 20 min zu rechnen (Jennings & Ganote 1974; Yeap et al. 2013). Beginnend an der Herzinnenwand (Endokard) erstreckt sich der Zelltod von Kardiomyozyten „wellenartig“ (*wavefront phenomenon*) und transmural über die myokardiale Schicht und dehnt sich Richtung Epikard aus (Reimer et al. 1977). Der inflammatorische Prozess tritt innerhalb von 24 h nach Infarktgeschehen ein. Die Aktivierung von Myofibroblasten wird bereits nach 72 h beobachtet und nach 14 Tagen post-Infarkt ist anzunehmen, dass auch die proliferative Phase

weitestgehend abgeschlossen ist (Humeres & Frangogiannis 2019; Prabhu & Frangogiannis 2016).

Das murine Modell der I/R stellt die experimentelle Grundlage der *in vivo* Versuche im Zuge dieser Doktorarbeit dar. Hierbei wurde zwischen zwei Protokollen; dem akuten und chronischen MI-Modell (siehe 2.4.4 und 2.4.5), unterschieden. Nach jeweils 30 min Ischämie wurde die Infarktgröße nach 2 h Reperfusion (akut) erfasst bzw. die Herzfunktion nach 28 Tagen Reperfusion (chronisch) untersucht.

### 1.2.1 Der myokardiale I/R-Schaden

Die Wiedereröffnung von Infarkt-betroffenen Koronargefäßen (z. B. durch PCI, Thrombolyse) ist die einzige Möglichkeit, den ischämischen Schaden am Myokard zu limitieren (Hausenloy & Yellon 2013). Entsprechend beruht das *in vivo* Modell der I/R auf der manuellen Wiedereröffnung der mechanischen LCA-Okklusion und ermöglicht so die Revaskularisierung des Risikoareals (Reperfusion). Paradoxaerweise führt die plötzliche Wiederherstellung des Blutflusses und die damit verbundene O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im zuvor ischämischen Herzmuskel zu einer zusätzlichen Schädigung des Myokards, was als myokardialer Reperfusionsschaden klinisch bedeutsam ist (Garcia-Dorado et al. 2009). Somit wird die Infarktgröße durch den Ischämie- und Reperfusionsschaden (*ischemia and reperfusion induced injury*, IRI) definiert. Es ist anzunehmen, dass die zusätzliche Myokardschädigung durch Reperfusion bis zu 50 % des gesamten kardialen Schadens ausmacht (Yellon & Hausenloy 2007).

Die Pathophysiologie der ischämischen Myokardschädigung wurde bereits detailliert in Kapitel 1.1.2.1 beschrieben und in Abb. 1.1 dargestellt. Verschiedene Prozesse am Herzen tragen zur Entstehung des Reperfusionsschadens bei. Beispielsweise wird dieser begünstigt durch das post-ischämische Auftreten von reversiblen ventrikulären Arrhythmien und einer transienten Dysfunktion (*myocardial stunning*) am Myokard (Hearse & Tosaki 1987; Klöner et al. 1998; Piper et al. 2003). Durch den zusätzlichen Zelltod noch intakter Kardiomyozyten in der Reperfusion, d. h. nach der Indexischämie, wird die irreversible Myokardschädigung maßgeblich mitbestimmt (Piper et al. 1998). Ein entscheidender zellulärer Faktor dafür ist das massive Überangebot von ROS, das durch die O<sub>2</sub>-Wiederverfügbarkeit getriggert wird (Sauerstoff-Paradoxon). Während der ischämischen Phase findet eine exzessive Akkumulation von Succinat durch Umkehrung des Succinat-Dehydrogenase (SDH, Komplex II)-katalysierten Vorgangs statt (Zuurbier et al. 2020). Die anschließend schnelle Oxidation des Citratzyklus-Metabolits zu Fumarat und Reaktivierung der Elektronentransportkette (ETC) zu Beginn der Reperfusion verursachen einen Elektronenrückfluss zu Komplex I am Mitochondrium und provozieren eine übermäßige Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-Generierung (Chouchani et al. 2014). Durch zusätzliche ROS-Produktion (*ROS-induced ROS release*) und Generierung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) in Anwesenheit von NO werden oxidative und nitrosative Schädigungen an zellulären Strukturen ausgelöst (Ferdinandy et al. 2007). Außerdem provozieren die ROS-induzierte Störung des SR und die gestörte Plasmamembranintegrität eine weitere Zunahme von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und die zytotoxische Ca<sup>2+</sup>-Überladung der Zelle, die bereits während der Ischämie eingeleitet wurde. Letztlich führt das Zusammenspiel aus ROS/RNS, Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation in der mitochondrialen

Matrix und pH-Verschiebung infolge der Reperfusion zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) (Abdallah et al. 2011). Das Öffnen des nicht-selektiven Ionenkanals an der inneren Mitochondrienmembran (IMM) verursacht eine mitochondriale Depolarisation, das Ausbleiben der oxidativen Phosphorylierung und eine ATP-Depletion der Zelle. Außerdem ist eine übermäßige  $[Ca^{2+}]_i$  ursächlich für eine Hyperkontraktur des Zytoskeletts und kann letztlich die Ruptur der Zellmembran auslösen (Piper et al. 2004; Yellon & Hausenloy 2007). In der Reperfusionsphase wird zudem die Wiederherstellung eines physiologischen pH-Werts angestrebt (Lemasters et al. 1996). Das dabei entstehende Protonen-Ungleichgewicht zwischen dem Intra- und Extrazellulärraums der Zelle aktiviert die Tätigkeit des NHE und provoziert damit einen zusätzlich zytotoxischen  $[Na^+]_i$ -Anstieg (Avkiran & Marber 2002). Des Weiteren löst die Akkumulation intrazellulärer Ionen osmotische Effekte aus, welche ein zelluläres Anschwellen und eine mechanische Überbeanspruchung von Kardiomyozyten hervorrufen (Garcia-Dorado et al. 2012; Garcia-Dorado & Oliveras 1993). Die Reperfusion des ischämischen Myokards ergänzt also durch unterschiedliche, aber zusammenhängende Zelltodmechanismen die Ausweitung des myokardialen Schadens. Von entscheidender Bedeutung sind die ersten Minuten der Reperfusion, die als kritische Phase den letalen Gewebeschaden auslösen und daher von großem klinischen Interesse für potentiell kardioprotektive Strategien sind (Piper et al. 2004).

## **1.2.2 Kardioprotektive Strategien zur Reduktion des kardialen I/R-Schadens**

Das adulte Myokard besitzt nur eine begrenzte regenerative Kapazität, den I/R-provozierten Zellschaden zu korrigieren und tote Kardiomyozyten zu ersetzen. Kardioprotektive Strategien ergänzend zur standardmäßig durchgeführten Reperfusionstherapie sind notwendig um die Infarktgröße nach akutem MI zu reduzieren und die Reparatur des I/R-geschädigten Myokards zu erleichtern (Heusch 2020). Im Tiermodell wurden ischämische und volatile Konditionierungsprotokolle mit protektivem Potential identifiziert, die nachfolgend näher betrachtet werden.

### **1.2.2.1 Ischämische Präkonditionierung (iPre)**

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (iPre) wurde erstmals 1986 durch Murry et al. beschrieben. An isolierten Hundeherzen wurde die LCA (*Ramus circumflexus*) viermalig für jeweils 5 min okkludiert und wiedereröffnet, gefolgt von einer Indexischämie von 40 min und einer 4-tägigen Reperfusion. Diese Konditionierungsstrategie führte zu einer erstmals beobachteten Infarktgrößenreduktion von ca. 75 % und war ausschlaggebend für die Begriffseinführung iPre (Murry et al. 1986). Ischämische Impulse vor dem hauptischämischen Ereignis zeigten wiederholt eine Zelltod-limitierende Wirkung (Iliodromitis et al. 1997; Liu & Downey 1992; Schott et al. 1990). Dabei unterteilt sich die iPre-vermittelte Kardioprotektion in ein akutes und verzögertes Zeitfenster. Ersteres, das sich durch eine ausgeprägte Protektion des Myokards auszeichnet, tritt zu Beginn der Reperfusionsphase für ein Intervall von 1 - 2 h auf (Jenkins et al. 1995). Das zweite protektive Zeitfenster, welches länger anhaltend aber weniger robust einen schützenden Effekt auf das Myokard bewirkt, ist ohne weitere Intervention nach 24 - 72 h zu beobachten (Yellon & Baxter 1995). Aufgrund der

Unvorhersehbarkeit eines MI ist das Prinzip der iPre im klinischen Alltag zunächst nicht anwendbar. Bei Patienten mit bestehender Angina Pectoris lässt sich jedoch beobachten, dass es nach dem Auftreten eines akut ischämischen Ereignisses zu einem tendenziell milderen Verlauf, einem geringeren myokardialen Schaden und einem verbesserten Funktionserhalt des Ventrikels kommt als bei Infarktpatienten ohne klinische Vorgeschichte (Rezkalla & Kloner 2004). Diese protektiven Effekte werden der Präinfarkt-Angina im Sinne einer Präkonditionierung zugesprochen.

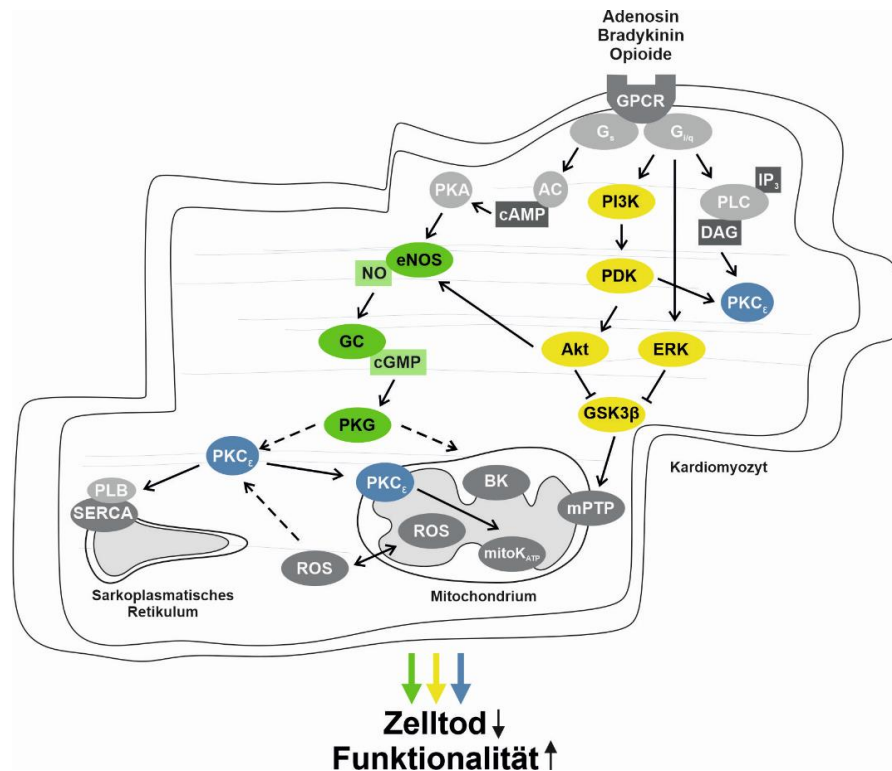
Auf der Suche nach der iPre-vermittelnden Signaltransduktion im Kardiomyozyt stellte sich heraus, dass eine Vielzahl verschiedenster Signalmoleküle zu diesem protektiven Phänomen beitragen (Abb. 1.3). Aufgrund der Komplexität und Zahl der beteiligten Prozesse und Signalkaskaden werden nachfolgend nur die zentralen Vertreter in Anlehnung an die Klassifikation (*mapping*) nach Downey et al. beschrieben (Downey et al. 2008; Heusch 2015). Die Systematik beruht auf der Unterteilung der Signaltransduktion in eine Triggerphase, initiiert durch extrazelluläre Stimuli und eine intrazelluläre Mediatorphase.

Als erste Triggersubstanz wurde Adenosin im Jahr 1991 von Liu et al. identifiziert. Durch intrakoronare Infusion mit einem Adenosin  $A_1$ -Rezeptor-selektiven Antagonist an Kaninchenherzen führte die Blockade des Adenosin  $A_1$ -Rezeptors am Sarkolemm zu einer Unterdrückung des iPre-Effekts (Liu et al. 1991). Neben dem Autakoid Adenosin wurden zusätzlich die endogene Substanz Bradykinin (Bell & Yellon 2003; Wall et al. 1994) und die Gruppe der Opiode (Schultz et al. 1995) identifiziert, die den protektiven Effekt von iPre initiieren. Allen drei Triggersubstanzen gemeinsam ist die Aktivierung  $G_{i/q}$ -gekoppelter Rezeptoren, zu denen die Adenosin  $A_1/A_3$ -Rezeptoren, der Bradykinin  $B_2$ -Rezeptor und die Opioid  $\kappa$ - und  $\delta$ -Rezeptoren zählen (Heusch 2015). Durch die Bindung der Liganden an die entsprechenden  $G_{i/q}$ -Proteine kommt es zur Blockade der Adenylatcyclase bzw. Stimulation der Phospholipase C, wodurch diverse intrazelluläre Signalwege angestoßen werden. Via Adenosin und Bradykinin wird in der Triggerphase der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalweg stimuliert, was wiederum mit der Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) einhergeht (Hausenloy et al. 2005; Tong et al. 2000). Zudem wird die PI3K durch Opiode unter Transaktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase *epidermal growth factor receptor* (EGFR) adressiert (Cao et al. 2005; Forster et al. 2007). Durch Rekrutierung der Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase (PDK) und Aktivierung der *downstream targets* Proteinkinase B (Akt) und *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) (Tong et al. 2000; Tong et al. 2002) sowie *p42/p44 extracellular signal regulated kinase* (ERK) (Fryer et al. 2001) werden wesentliche kardioprotektive Effekte von iPre vermittelt. Als Endpunkt des RISK-Signalwegs gilt zum aktuellen Zeitpunkt die GSK3 $\beta$ , die durch Phosphorylierung in inhibiertem Zustand vorliegt, was letztlich die Öffnung der mPTP verhindert.

Die Aktivierung von Akt kann im Folgenden die NO/GC/cGMP-Signalkaskade anstoßen (Costa et al. 2008). Durch die Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) generiert (Dimmeler et al. 1999), das wiederum die lösliche Guanylylzyklase (GC) aktiviert, welche den sekundären Botenstoff zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat (cGMP) synthetisiert. Das Effektmolekül dieser Signalachse ist die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (PKG oder cGKI), die v. a. die mitochondriale Integrität als kardioprotektive Maßnahme moduliert (Costa et al. 2005). Dies gelingt

beispielsweise durch Interaktion mit den K<sup>+</sup>-Kanälen an der IMM der Kardiomyozyten, zu denen der mitochondriale ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanal mitoK<sub>ATP</sub> (Costa et al. 2006; Oldenburg et al. 2002; Oldenburg et al. 2004) und der mitochondriale K<sup>+</sup>-Kanal mit hoher Leitfähigkeit BK (Frankenreiter et al. 2017; Goswami et al. 2018) zählen.

Ein weiteres Schlüsselement der iPre-vermittelten Signaltransduktion ist die Proteinkinase C (PKC) als Mediatorprotein zwischen Zytoplasma und Mitochondrium der Zelle (Costa et al. 2008). Unter Verwendung des PKC-Inhibitors Chelerythrin zeigten Downey et al. erstmals eine Aufhebung des iPre-vermittelten Herzschutzes bei I/R *in vivo* (Liu et al. 1994a; Ytrehus et al. 1994). In Abhängigkeit der Spezies dominieren verschiedene PKC-Isoformen am Myokard. Während in größeren Säugetieren die α-Isoform am iPre-vermittelten Herzschutz beteiligt ist (Schulz et al. 2003), wird in Nagetieren der ε-Isoform eine entsprechende protektive Funktion bei iPre zugesprochen (Inagaki et al. 2006; Ping et al. 2002). Infolge der Aktivierung von G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren (G<sub>q</sub>PCRs) wie z. B. A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub>-Rezeptoren durch die Triggersubstanz Adenosin, kann die PKCε durch Interaktion mit dem sekundären Botenstoff Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden (Downey et al. 2007). Des Weiteren kann die PKCε-vermittelte Kardioprotektion durch die *upstream*-Aktivierung von PI3K sowie zellulären Signalkaskaden (Heusch 2015) oder ROS (Korichneva et al. 2002) initiiert werden. Ausgehend von einer Translokationstheorie ist die im Zytoplasma vorliegende PKCε nach Aktivierung durch iPre befähigt, ihre Lokalisation in der Zelle zu verändern (Liu et al. 1994b). Beispielsweise führt ein Hitzeschockprotein 90 (HSP90)-gesteuerter Prozess zum Import der PKCε ins Mitochondrium (Budas et al. 2010), wo die Kinase durch Interaktion mit mitoK<sub>ATP</sub> einen Organell- und somit Zell-protectiven Effekt in Bezug auf die ROS-Formierung und den mPTP-Öffnungszustand ausübt (Costa & Garlid 2008). Eine Translokation der PKC findet auch an weiteren Organellen wie z. B. am SR statt, an dem die Kinase eine positive Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Gehalts durch Phospholamban (PLB)-Dephosphorylierung bei simulierter I/R bewirkt (Yamamura et al. 2005). Funktionale Proteomik-Analysen am Herzen identifizierten zudem eine Vielzahl an PKCε-assoziierten Multiproteinkomplexe, die letztlich als Sinnbild für die komplexe und noch unvollständig verstandene, molekulare Infrastruktur bei Kardioprotektion zu betrachten ist (Ping et al. 2001).



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung wesentlicher Signalmoleküle bei ischämischer Präkonditionierung**

In der Triggerphase werden u. a. die endogenen Substanzen Adenosin und Bradykinin sowie Opioiden freigesetzt, die über ihre korrespondierenden Rezeptoren (GPCR) an die Herzmuskelzelle binden (Details siehe 1.2.2.1). Dies führt beispielsweise zur Aktivierung des RISK-Signalwegs (gelb) oder der NO/GC/cGMP-Signalkaskade (grün). Die PKCε (blau) als wesentlicher Mediator von iPre adressiert unterschiedliche Kompartimente, darunter das SR und die Mitochondrien der Zelle, um den kardioprotektiven Impuls zu vermitteln. Das Schema wurde modifiziert nach (Heusch 2015). AC: Adenylatcyclase, Akt: Proteinkinase B, BK: Ca<sup>2+</sup>-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanal mit großer Leitfähigkeit, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP: zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat, DAG: Diacylglycerol, eNOS: endotheliale NO-Synthase, ERK: *p42/p44 extracellular signal regulated kinases*, GC: lösliche Guanylatzyklase, GSK3β: Glykogensynthase-Kinase-3β, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-triphosphat, mitoK<sub>ATP</sub>: mitochondrialer ATP-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanal NO: Stickstoffmonoxid, PDK: Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, PKA: Proteinkinase A, PKCε: Proteinkinase C ε-Typ, PKG: cGMP-abhängige Proteinkinase, PLB: Phospholamban, PLC: Phospholipase C, SERCA: *sarkoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*.

### 1.2.2.2 Ischämische Postkonditionierung (iPost)

Die ischämische Postkonditionierung (iPost) beschreibt kurzfrequente ischämische Impulse, die durch wiederholte Okklusion des Koronargefäßes hervorgerufen werden und die direkt im Anschluss an die Indexischämie zu einer Reduktion der Infarktgröße beitragen. Ein protektives Konditionierungsprotokoll wurde erstmals 2003 von Zhao et al im I/R-Modell *in vivo* an Hunden etabliert. Die Wissenschaftler zeigten, dass 3 Zyklen à 30 s Reperfusion/30 s Reokklusion unmittelbar nach 60 min Ischämie zu einer iPre-gleichwertigen Verminderung des myokardialen Schadens führten (Zhao et al. 2003). Im Folgenden wurden eine Vielzahl verschiedener iPost-Protokolle untersucht (Kin et al. 2004; Yang et al. 2004). Obwohl der optimale Algorithmus von Reperfusion/Reokklusion bzgl. der Dauer und der Wiederholungszahl noch nicht definiert werden konnte, gilt der notwendige Zeitpunkt der

Intervention unmittelbar nach der Ischämie innerhalb der ersten Minuten der Reperfusionphase als gesichert (Heusch 2013).

Im Gegensatz zu iPre bietet iPost eine konkrete Perspektive zur Anwendung bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit und planbaren Ereignissen wie beispielsweise einer PCI oder der Koronararterien-Bypass-Chirurgie (Hausenloy & Yellon 2013). Ein kardioprotektiver Effekt durch iPost am humanen Myokard wurde erstmals von Staat et al. 2005 berichtet. In einer randomisierten klinischen Studie mit 30 MI-Patienten bestätigte sich ein iPost-vermittelter Herzschutz anhand der Evaluation relevanter Biomarker (z. B. Kreatinkinase) nach koronarer Angioplastie (Staat et al. 2005). Weitere klinische Studien mit heterogenen Ergebnissen bzgl. der kardioprotektiven Effektivität von iPost folgten (Freixa et al. 2012; Hahn et al. 2013; Laskey et al. 2008; Thibault et al. 2008; Thuny et al. 2012). Zuletzt konnte der klinische Nutzen von iPost als routinemäßige Maßnahme im Zuge einer primären PCI in einer groß-angelegten dänischen Studie (DANAMI-3-iPOST) mit 1234 Patienten nicht bestätigt werden (Engstrom et al. 2017).

Die Signaltransduktion von iPost scheint weitestgehend mit den zellulären Mechanismen von iPre (siehe 1.2.2.1) übereinzustimmen (Hausenloy et al. 2005; Heusch 2013). Die Substanzen Adenosin, Bradykinin und Opioide werden durch I/R von unterschiedlichen Zelltypen wie Kardiomyozyten, Endothelzellen oder Neuronen freigesetzt und triggern intrazelluläre Mediator-Kaskaden via Plasmamembran-ständige Rezeptoren (GPCR, EGFR) (Heusch 2015; Yang et al. 2005b). Während bei iPre-vermitteltem Herzschutz die Adenosin  $A_1/A_3$ -Rezeptoren im Vordergrund stehen, werden bei iPost die Adenosin  $A_{2A}/A_{2B}$ -Rezeptoren zu Reperfusionbeginn aktiviert (Methner et al. 2010). Intrazellulär folgt erneut die Aktivierung des RISK-Signalwegs via Akt und ERK und der NO/GC/cGKI Signalachse (Costa et al. 2008; Tsang et al. 2004; Yang et al. 2004). Die aktivierte cGKI interagiert maßgeblich mit  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  zur Modulation des ROS-Levels um ein Öffnen der mPTP zu vermeiden (Burley et al. 2007). Bei iPost wurde zudem eine kardioprotektive Interaktion zwischen cGKI und NHE diskutiert, welche die pH-Wert-Verschiebung der Zelle inhibiert (Inserte et al. 2011).

Neben der endogenen Aktivierung von *pro-survival* Kinasen scheint der Erhalt der intrazellulären Azidose zu Beginn der Reperfusion von entscheidender Bedeutung für den iPost-vermittelten Herzschutz zu sein (Fujita et al. 2007). Dieses Phänomen wurde 2007 von Cohen et al. als pH-Hypothese vorgestellt. Diese besagt, dass die verlangsamte Reperfusion des Myokards durch repetitive Gefäßokklusion eine Normalisierung des physiologischen pH-Werts verzögert (Cohen et al. 2007). Die intrazelluläre Azidose bewirkt eine Suppression der mPTP, erhält das mitochondriale Membranpotential und schützt letztlich vor Zelltod. Die Modulation des pH-Werts nach akutem MI wurde bereits als Therapieansatz diskutiert, das beispielsweise durch pharmakologische Inhibition von NHE umsetzbar wäre (Hausenloy & Yellon 2013).

### 1.2.2.3 Volatile Konditionierung (AC)

Die myokardiale Konditionierung durch ein volatiles Anästhetikum (AC, *anesthetic conditioning*) ist ein pharmakologischer Ansatz bei I/R, um die endogene Kardioprotektion der ischämischen Konditionierung nachzuahmen (Roth et al. 2021). In der Literatur werden

hauptsächlich die volatilen Anästhetika (VA) Isofluran, Sevofluran und Desfluran mit Myokardprotektivem Effekt bei I/R genannt. In Abhängigkeit des Flurans und der Tierspezies variiert der notwendige Zeitpunkt (vor oder nach der Indexischämie) und die Dauer der Applikation, um einen protektiven Nutzen zu erzielen (Chen et al. 2018a; Lemoine et al. 2016; Redel et al. 2009; Tsutsumi et al. 2006). Der Begriff AC beinhaltet die anästhetische Präkonditionierung (APC) vor der Indexischämie und die anästhetische Postkonditionierung (APOST) zu Beginn der Reperfusion. Mechanistisch unterliegen APC und APOST derselben Signaltransmission, die zunächst am Sarkolemm initiiert wird. Der schützende Effekt durch AC findet letztlich auf Organellebene in den Kardiomyozyten statt (Lotz & Kehl 2015).

Eine potentiell kardioprotektive Eigenschaft von Isofluran wurde erstmals in der Studie von Warltier et al. im Jahr 1988 postuliert. Die intraoperative Inhalation von Isofluran bei I/R an Hunden vermittelte eine mildere linksventrikuläre Dysfunktion und verbesserte Regeneration der Myokardtätigkeit (Warltier et al. 1988). Weitere Studien zeigten eine deutliche Infarktgrößenreduktion durch APC und APOST in verschiedenen I/R-Modelle (Kersten et al. 1997; Lotz & Kehl 2015; Redel et al. 2009). Die AC-vermittelte Kardioprotektion wird durch Stimulation diverser Oberflächenrezeptoren, darunter G<sub>i</sub>-gekoppelte Rezeptoren (Toller et al. 2000), β<sub>1</sub>/β<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptoren (Lange et al. 2009) und Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren (Roscoe et al. 2000) initiiert. In Übereinstimmung mit iPre wird auch bei AC der zytoplasmatische RISK-Signalweg unter Beteiligung der *pro-survival* Kinasen PI3K und Akt angestoßen (Raphael et al. 2005). Ergänzt wird die Signalkaskade durch Phosphorylierung und Interaktion mit ERK und PKC<sub>ε</sub> (Toma et al. 2004). Durch die mitochondriale Translokation der PKC<sub>ε</sub> und Aktivierung von mitoK<sub>ATP</sub> gelingt die Inhibition der mPTP als wesentliche Maßnahme der AC-vermittelten Kardioprotektion (Kersten et al. 1997; Pravdic et al. 2009). Die Phosphorylierung von Akt führt zudem zu einer Aktivierung der eNOS und Verstärkung des mitochondrialen Mechanismus via NO (Ge et al. 2010). Zelltod-limitierend ist außerdem die inhibitorische Phosphorylierung der GSK-3β (Feng et al. 2005) oder die Modulation von Apoptoseregulatoren wie Bcl-2 (Raphael et al. 2006).

Die Rekrutierung des *janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3* (JAK/STAT3)-Signalwegs ergänzt die Komplexität der AC-vermittelten Signaltransduktion (Wu et al. 2017). Zudem scheinen die Effekte der AC durch microRNA (miRNA)-Expressionslevel reguliert zu sein. In einem murinen I/R-Modell zeigte sich beispielsweise nach Sevofluran-Konditionierung eine reduzierte miR-155-Expression, was eine gesteigerte Sirtuin 1 (SIRT1)-Proteinexpression und reduzierte Infarktgröße zur Folge hatte (Huang et al. 2019). Zusammenfassend unterliegt auch die AC einer hochkomplexen Signalkaskade im Rahmen derer eine Vielzahl verschiedener zellulärer Komponenten beteiligt sind, wovon nur ein Ausschnitt in diesem Kapitel genannt wurde.

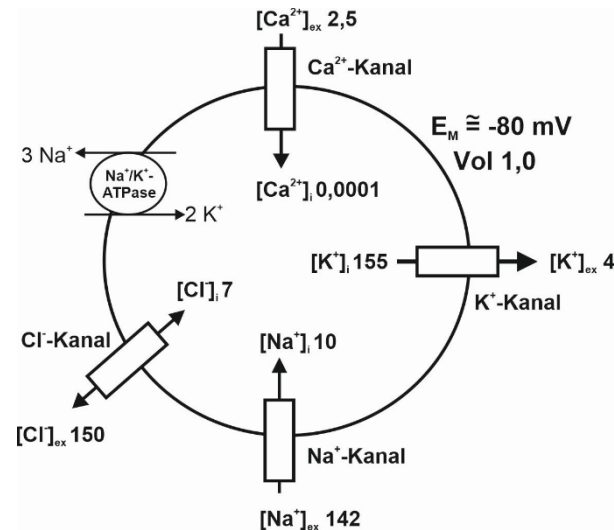
### 1.3 K<sup>+</sup>-Dynamik am Herzen

Kaliumionen (K<sup>+</sup>) sind von großer Bedeutung für den Metabolismus und die Erregbarkeit der Zellen. Außerdem trägt es als Hauptkation der intrazellulären Flüssigkeit wesentlich zur zellulären Osmolarität und zur Regulation des Membranpotentials bei (Palmer 2015). Durch die Aktivität der Plasmamembran-ständigen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wird ein steiler K<sup>+</sup>-Ionengradient zwischen dem Intra- ([K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>: 140 - 150 mM) und Extrazellulärraum der Zelle ([K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub>: 3,5 - 5 mM) geschaffen (Thier 1986). Somit liegt 98 % des Gesamtkaliumgehalts im Organismus intrazellulär vor (Dursun & Sahin 2006). Bereits geringe Veränderungen der K<sup>+</sup>-Serumkonzentration können schwere (neuro-/kardio-)muskuläre Störungen auslösen. Aus diesem Grund ist die renale K<sup>+</sup>-Sekretion ein hochdynamischer Prozess, bei dem sich die Verfügbarkeit von Transportsystemen an der Niere (z.B. *epithelial Na<sup>+</sup>-channel* (ENaC) und *renal outer medullary K<sup>+</sup>-channel* (ROMK)) permanent der [K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub> anpasst. Ergänzend dazu wird der extrarenale K<sup>+</sup>-Stoffwechsel durch die Hormone Insulin und α-/β-adrenerge Katecholamine gesteuert (Nguyen et al. 2011; Palmer & Clegg 2016).

Das Myokard als erregbare Einheit ist auf eine stabile K<sup>+</sup>-Homöostase (*internal K<sup>+</sup> balance*) angewiesen. Funktional untergliedert es sich in ein Reizleitungssystem, das für die Weiterleitung elektrischer Erregungen verantwortlich ist und ein Arbeitsmyokard, das die Pumpleistung des Herzens übernimmt. Das Ruhemembranpotential der Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards wird vorwiegend durch passive K<sup>+</sup>-Diffusion reguliert (Fozzard & Sheu 1982). Findet eine elektrische Erregung am Herzen statt, trägt der aktive K<sup>+</sup>-Efflux in der Repolarisationsphase zur Gestaltung des Aktionspotentials bei (Pfeiffer et al. 2014). In diesem Sinne führt auch ein Ungleichgewicht der, an der elektromechanischen Kopplung beteiligten, Ionen wie z. B. K<sup>+</sup> zu einer Beeinträchtigung der Herztätigkeit. Oftmals ist eine akut auftretende Arrhythmie bei Patienten mit kardialer Vorerkrankung (z. B. MI, HI) das Resultat einer Entgleisung des K<sup>+</sup>-Gradienten (Sarwar et al. 2016; Schwinger & Erdmann 1992). Insbesondere ein K<sup>+</sup>-Serumspiegel von < 3 mM (Hypokaliämie) birgt ein hohes Risikopotential für ventrikuläre Tachyarrhythmien oder plötzlichen Herztod (Kjeldsen & Schmidt 2019). Das mögliche Auftreten einer Hyperkaliämie (> 5 mM) ist bei Patienten mit chronischer Nieren- und Herzerkrankung ggf. unter Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)-Hemmer-Therapie zu beachten (Palmer 2004). Sowohl tachykarde als auch bradykarde Herzrhythmusstörungen zählen zu den kardialen Symptomen einer Hyperkaliämie. Zudem zeigten Krogager et al., dass ein veränderter K<sup>+</sup>-Serumspiegel außerhalb des Referenzbereichs (3,9 mM - 4,5 mM) mit einer signifikanten Zunahme des Mortalitätsrisikos nach akutem MI einhergeht. Mechanistisch provoziert das K<sup>+</sup>-Ungleichgewicht eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials der Kardiomyozyten, was entweder zu einem hyperpolarisierten Zustand oder einer gesteigerten Erregbarkeit der Zelle führen kann (Dixon & Abbate 2015; Krogager et al. 2015).

Die Aufrechterhaltung der K<sup>+</sup>-Homöostase am Herzen wird durch verschiedene K<sup>+</sup>-Transportsysteme geregelt. Für den Erhalt der Potentialdifferenz am Sarkolemm dominiert die Tätigkeit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase als ubiquitär exprimiertes, elektrogenes Transportsystem. Aufgrund seiner aktiven Ionentransportprozesse für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> leistet es einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials von ca. -80 mV in erregbaren Zellen wie z.B. Neurone oder Kardiomyozyten (Pivovarov et al. 2018). Im Austausch von 3 Na<sup>+</sup>

werden 2  $K^+$ -Ionen entgegen des Ionengradienten und durch ATP-Verbrauch in die Zelle transferiert (Post & Jolly 1957). Durch die Tätigkeit der Ionenpumpe entsteht so eine intrazelluläre Verteilung von ca. 150 mM  $[K^+]_i$  und 10 mM  $[Na^+]_i$  (Ackerman & Clapham 1997; Singh 2021). Umgekehrt ist die extrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration ( $[Na^+]_{ex}$  142 mM) um ein Vielfaches höher als  $[K^+]_{ex}$  (4 mM). Die nachfolgende Abb. 1.4 illustriert schematisch die physiologische Ionenverteilung in der Zelle zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials.



**Abb. 1.4 Ionenverteilung in der erregbaren Zelle**

Die Zelle ist mit  $Na^+$ -,  $K^+$ -,  $Cl^-$ -Ionenkanälen ausgestattet, die einen passiven Ionentransport über die Plasmamembran gewähren. Im nicht aktiven Zustand ist die Zelle kaum permeabel für  $Na^+$  ( $P_{Na}$  0,02), jedoch passierbar für  $K^+$  ( $P_K$  1,0) und  $Cl^-$  ( $P_{Cl}$  2,0) (in a.u.) (Armstrong 2003). Durch einen aktiven Transportmechanismus unter ATP-Verbrauch findet die Ausschleusung von 3  $Na^+$  und Einschleusung von 2  $K^+$  via  $Na^+/K^+$ -ATPase statt. Das Ruhemembranpotential liegt bei ca. -80 mV und das zelluläre Volumen bei 1,0 a.u.. Durch die Extrusion von  $[Cl^-]_i$  entsteht ein „osmotischer Raum“, um ggf. Osmolaritätsunterschiede zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum auszugleichen. Die jeweilige Ionenkonzentration ( $[X]_{i/ex}$ ) ist in mM dargestellt. Das Schema wurde erstellt nach (Armstrong 2003) und (Ackerman & Clapham 1997).

Zusätzlich reguliert der aktive Transport von  $Na^+$  und  $K^+$  via  $Na^+/K^+$ -ATPase die osmotische Stabilität der Zelle. Armstrong präsentierte 2003 eine modifizierte Gleichung als analytisches Hilfsmittel, das den Beitrag der  $Na^+/K^+$ -ATPase und des Membranpotentials (via  $Na^+/-K^+/-Cl^-$ -Ionenkanäle) zur Regulation der zellulären Osmolarität mathematisch erfasst (Armstrong 2003).

Am Myokard ist die  $Na^+/K^+$ -ATPase für den Erhalt der physiologischen Zellfunktion durch die Regulation der  $Na^+$ -Homöostase, des Zellvolumens und der elektrischen Aktivität verantwortlich. Eine pathophysiologische Beeinträchtigung der  $Na^+/K^+$ -ATPase führt zu einer gestörten Myokardtätigkeit und kardiomyozytären Zelltod (Liu et al. 2012; Semb et al. 1998). Dies ist beispielsweise unter ischämischen Bedingungen (siehe 1.1.2.1) der Fall. Die Ischämie-bedingte ATP-Verarmung der Zelle provoziert eine Inhibition der  $Na^+/K^+$ -ATPase und ist u. a. ursächlich für die kontraktile bzw. elektrische Dysfunktion am Herzen (Cross et al. 1995; Hua et al. 2018; Van Emous et al. 2001). Umgekehrt zeigte sich durch Aktivierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase ein kardioprotektiver Effekt an I/R-exponierten Herzen basierend auf der Stimulation der PI3K/Akt/ERK-Signalachse (Zheng et al. 2011).

Bei der Behandlung von HI-Patienten stellt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine wichtige Zielstruktur für die Pharmakotherapie dar (Wang et al. 2017). Der Einsatz von herzwirksamen Glykosiden, wie z. B. Digoxin und Digitoxin, inhibiert die Ionenpumpe, was zu einem Anstieg von  $[\text{Na}^+]_i$  führt und somit zu einer Reduktion des transmembranären Konzentrationsgefälles. Folglich ist der elektrogene Transport via NCX abgeschwächt, ein höherer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anteil verbleibt in der Zelle und steigert die elektromechanische Kopplung (positiv inotrop) am Herzen. Bei der Untersuchung genetisch manipulierter Mäuse durch heterozygote Deletion der  $\alpha_1$ - oder  $\alpha_2$ -Isoform der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zeigte sich, dass insbesondere die  $\alpha_2$ -Isoform am Herzen für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik während der kardialen Kontraktion verantwortlich ist (James et al. 1999). Die pharmakologische Modulation der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sollte kritisch in Hinblick auf die Reorganisation der Ionenverteilung von  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  für das jeweilige Krankheitsbild hinterfragt werden. Neben den Herzglykosiden führen auch andere Therapeutika indirekt zu einer Beeinflussung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Tätigkeit. Im Rahmen einer HI-Therapie bewirkt beispielsweise der Einsatz von Diuretika und der dadurch bedingte  $\text{K}^+$ -Verlust eine Reduktion der Enzymaktivität, während ACE-Hemmer einen aktivierenden Effekt auslösen (Kjeldsen 2003).

### 1.3.1 Plasmamembranständige $\text{K}^+$ -Kanäle

Neben der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sind die plasmamembranständigen Ionenkanäle verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials erregbarer Zellen. Die Ruheleitfähigkeit für  $\text{K}^+$  ist hoch, sodass die transzelluläre Spannung der Zelle (ca. -80 mV) nahe des negativen Gleichgewichtspotentials von  $\text{K}^+$  (ca. -90 mV) liegt (Abdul Kadir et al. 2018; Salkoff et al. 2006). Das kardiomyozytäre Ruhemembranpotential wird primär durch den  $\text{K}^+$ -Efflux durch *inward rectifier*  $\text{K}^+$ -Kanäle Kir 2.1/2.2 ( $\text{I}_{\text{K}1}$ ) stabilisiert (Grant 2009). Ist die Zelle nicht erregt, liegen diese im geöffneten Zustand vor und ermöglichen eine passive  $\text{K}^+$ -Diffusion aus der Zelle. Erst infolge einer Depolarisation der Plasmamembran nimmt die Offen-Wahrscheinlichkeit dieser Kanäle ab (Baronas & Kurata 2014). Aus diesem Grund werden die spannungsabhängigen, einwärtsgleichrichtenden Kir 2.x-Kanäle auch als „abnorme“ Kir-Kanäle bezeichnet (Hibino et al. 2010).

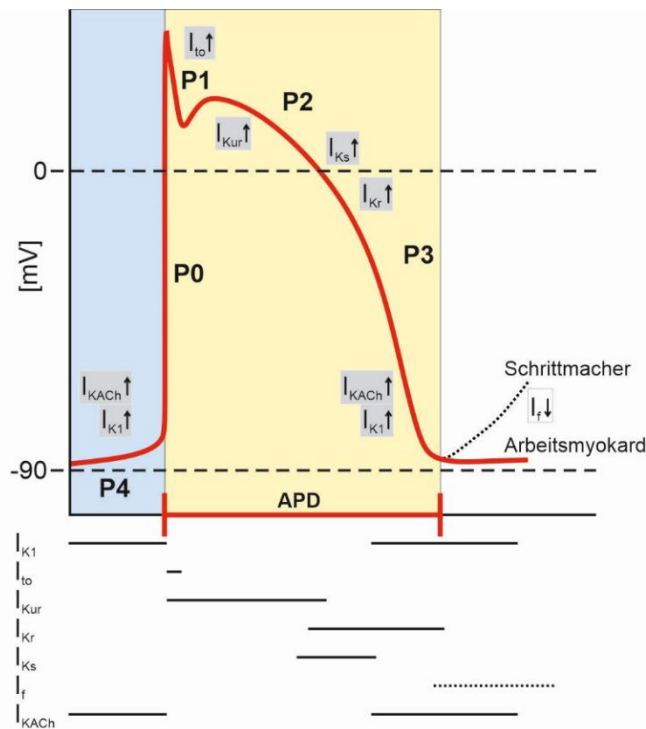
Zusätzlich ist das Myokard mit einer großen Anzahl plasmamembranständiger  $\text{K}^+$ -Kanäle ausgestattet, die v. a. für die präzise Gestaltung des Aktionspotentials zuständig sind (Abb. 1.5). Während  $\text{Na}^+$ -Kanäle die elektrische Erregung initiieren und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle die elektromechanische Kopplung umsetzen, regulieren  $\text{K}^+$ -Kanäle die Dauer des Aktionspotentials durch Modulation der Repolarisationsphase (Jeevaratnam et al. 2018). Die  $\text{K}^+$ -Kanaltypen unterscheiden sich wesentlich in ihrer Kinetik und den regulatorischen Eigenschaften, wie z. B. der  $\text{K}^+$ -Permeabilität, des Öffnungs-/Schließungsmechanismus oder des Inaktivierungszustands. Dadurch existieren viele diverse  $\text{K}^+$ -Ströme, die spezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Aktionspotentials und im Zuge der Repolarisation agieren. Aus diesem Grund werden die  $\text{K}^+$ -Kanäle auch anhand ihres Ionenstroms ( $\text{I}_x$ ) kategorisiert. Eine Systematik ist in Tabelle 1.1 durch das Prinzip ihres Ionentransports (*gating*) gegeben. Prinzipiell wird am Myokard zwischen den

spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanälen, den Ligand-gesteuerten K<sup>+</sup>-Kanälen und den mechanosensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen unterschieden (Grant 2009).

**Tabelle 1.1 K<sup>+</sup>-Membranströme am Herzen**

<b>Aktivierungsmechanismus</b>	<b>Strom</b>	<b>K<sup>+</sup>-Kanal</b>	<b>Kanalprotein (α-UE)</b>
Spannung	I <sub>K1</sub>	<i>K<sup>+</sup> inward rectifier</i>	Kir 2.1/2.2
Spannung	I <sub>to,s</sub>	<i>K<sup>+</sup> transient outward, slow</i>	Kv 1.4/1.7/3.4
Spannung	I <sub>to,f</sub>	<i>K<sup>+</sup> transient outward, fast</i>	Kv 4.2/4.3
Spannung	I <sub>Ks</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, slow</i>	KVLQT1
Spannung	I <sub>Kr</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, rapid</i>	HERG
Spannung	I <sub>Kur</sub>	<i>K<sup>+</sup> delayed rectifier, ultra rapid</i>	Kv 1.5/3.1
Spannung	I <sub>f</sub>	funny-Kanal, <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN)</i>	HCN2/4
Ligand-gesteuert	I <sub>KACh</sub>	<i>G-protein coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel (GIRK)</i>	Kir 3.1/3.4
Ligand-gesteuert	I <sub>KATP</sub>	ATP-sensitiver K <sup>+</sup> -Kanal (K <sub>ATP</sub> )	Kir 6.2
Ligand-gesteuert	I <sub>SK</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal mit geringer Leitfähigkeit	KCNN2, KCNN3
Ligand-gesteuert	I <sub>KNa</sub>	Na <sup>+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal	
Metabolismus, Dehnung	I <sub>KP</sub>	<i>Two-pore-domain K<sup>+</sup>-Kanal (K<sub>2P</sub>)</i>	TASK-1, TREK-1

Ein Aktionspotential am Myokard wird nach Überschreitung des Schwellenpotentials von -60 bis -65 mV in der Aufstrichphase (Phase 0) durch einen Na<sup>+</sup>-Einstrom (I<sub>Na</sub>) initiiert. Die nachfolgende partielle Repolarisation (Phase 1) wird durch transiente K<sup>+</sup>-Auswärtsströme (*transient K<sup>+</sup> outward currents, fast (I<sub>to,f</sub>)/slow (I<sub>to,s</sub>)*) durch die Aktivierung spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>v</sub>) mediiert (Nerbonne & Kass 2005). Während der Plateauphase (Phase 2) erfolgt ein stetiger Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, welcher die Erregung (Exzitation) mit einer mechanischen Herzaktion (Kontraktion) koppelt (Pfeiffer et al. 2014). Terminiert wird das Plateau durch einen starken K<sup>+</sup>-Ausstrom (Phase 3) via schneller und langsamer auswärtsgerichteter Kanäle (*outward delayed rectifier: slow (I<sub>Ks</sub>), rapid (I<sub>Kr</sub>), ultra rapid (I<sub>Kur</sub>)*). Auch diese K<sup>+</sup>-Kanäle sind einem spannungsabhängigen Aktivierungsmechanismus zuzuordnen (Nattel et al. 1999). Die unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Ionenströme zur Generierung eines Aktionspotentials am Myokard sind schematisch in nachfolgender Abb. 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5 K<sup>+</sup>-Dynamik zur Generierung eines Aktionspotentials**

Schematische Darstellung von K<sup>+</sup>-Strömen ( $I_x$ ) an der myozytären Plasmamembran, die zur Generierung eines Aktionspotentials beitragen. Es werden 5 Phasen unterschieden: P0 (Aufstich), P1 (partielle Repolarisation), P2 (Plateau), P3 (Repolarisation), P4 (Ruhemembranpotential). Mit Ausnahme von  $I_f$  sind die K<sup>+</sup>-Ströme  $I_{KACH}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$ , und  $I_{Ks}$  auswärtsgerichtet (in grau hinterlegt). In Schrittmacherzellen wird durch  $I_f$  eine erneute Erregung der Zelle ausgelöst (gestrichelte Linie). Die Aktionspotentialdauer (APD) beträgt ca. 200 ms. Das Schema wurde modifiziert nach (Grant 2009).

$I_f$ : *funny*,  $I_{KACH}$ : Acetylcholin-gesteuert,  $I_{K1}$ : *inward rectifier*,  $I_{to}$ : *transient outward*,  $I_{Kur}$ : *ultra rapid outward delayed rectifier*,  $I_{Kr}$ : *rapid outward delayed rectifier*,  $I_{Ks}$ : *slow outward delayed rectifier*.

K<sub>v</sub>-Kanäle ändern ihre K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit in Abhängigkeit des Membranpotentials. Meist nimmt der Offenzustand dieser Kanäle bei Depolarisation der Zellmembran zu. Dies trifft jedoch nicht für den Schrittmacher-Kanal *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel* (HCN) zu, der in Kardiomyozyten des Reizleitungssystems (des Sinusknoten) exprimiert ist (Zicha et al. 2005). Die hyperpolarisationsaktiven Kationen-Kanäle (auch *funny*-Kanäle genannt,  $I_f$ ), die für die monovalenten Kationen Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> permeabel sind ( $P_{Na/K}$ : 0,25), öffnen bei der Unterschreitung des Membranpotentials von -60 mV. Dabei korreliert die Stromgröße von  $I_f$  wesentlich mit  $[K^+]_{ex}$ , d. h. der Schrittmacherstrom steigt mit zunehmender  $[K^+]_{ex}$  (Hoppe 2009). Aus physiologischer Sicht verhindert die K<sup>+</sup>-abhängige  $I_f$ -Kanaleigenschaft bradykarde Effekte bei Hyperkaliämie. Die Aktivierung von  $I_f$  in sinuatrialen Zellen liegt im Bereich des physiologischen diastolischen Ruhemembranpotentials und stimuliert durch Kationeninflux v.a. Na<sup>+</sup> eine Membrandepolarisation und Generierung eines neuen Aktionspotentials. (Robinson & Siegelbaum 2003).

Zu den Ligand-gebundenen K<sup>+</sup>-Kanälen zählt der Acetylcholin (ACh)-gesteuerte und G-Protein gekoppelte K<sup>+</sup>-Kanal GIRK (*G-protein coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel*). Die Aktivierung des einwärtsgerichteten K<sup>+</sup>-Kanals ( $I_{KACH}$ ) resultiert nach ACh-Bindung des muskarinergen M<sub>2</sub>-Rezeptors und Aktivierung der G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Signalkaskade via G<sub>βγ</sub>-Untereinheit. Durch die GIRK-Expression im Reizleitungssystem führt  $I_{KACH}$  zu einer

negativ chronotropen (Schlagfrequenz-reduzierenden) Wirkung am Myokard (Jeevaratnam et al. 2018; Wang et al. 2013). Ein weiterer Ligand-gebundener prominenter  $K^+$ -Kanal ist der plasmamembranständige ATP-sensitive  $K^+$ -Kanal ( $K_{ATP}$ ). Unter physiologischen Bedingungen liegt  $K_{ATP}$  hauptsächlich im geschlossenen Zustand vor und spielt für die Erregbarkeit der Zelle nur eine untergeordnete Rolle (Nichols et al. 2013). Jedoch koppelt  $K_{ATP}$  die myokardiale Erregungsbildung an den pathophysiologisch-veränderten metabolischen Status der Zelle. Beispielsweise findet unter Ischämie eine intrazelluläre ATP-Verarmung statt (siehe 1.1.2.1), was wiederum eine Aktivierung von  $K_{ATP}$  ( $I_{KATP}$ ) zur Folge hat (Akao et al. 1997). Der resultierende  $K^+$ -Efflux führt konsequenterweise zu einer Reduktion der Aktionspotential-Dauer (APD). Es wird postuliert, dass die dadurch bedingte Energieersparnis einen kardioprotektiven, Zelltod-verzögernden Effekt auf das Ischämie-betroffenen Myokard hat. Neben  $I_{KACH}$  und  $I_{KATP}$  sind weitere Ligand-gesteuerte  $K^+$ -Ströme an der Plasmamembran lokalisiert, die durch  $Ca^{2+}$  (via  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (SK),  $I_{SK}$ ) oder  $Na^+$  (via  $Na^+$ -sensitive  $K^+$ -Kanäle ( $K_{Na}$ ),  $I_{KNa}$ ) aktiviert werden (Grandi et al. 2017). Die  $K_{Na}$ -Kanäle werden nachfolgend und ausführlich in Kapitel 1.4 beschrieben.

Der Vollständigkeit halber sind die mechanosensitiven  $K^+$ -Kanäle als regulatorische Einheit der Erregungsleitung am Myokard zu nennen. Eine Änderung der  $K^+$ -Leitfähigkeit dieser Kanäle ( $I_{KP}$ ) wird durch einen physikalischen Stimulus wie z. B. durch Membrandehnung, Änderung des pH-Werts oder Temperatur ausgelöst. *Two-pore-domain*  $K^+$ -Kanälen ( $K_{2P}$ ) wie TREK-1 und TASK-1 werden dieser Gruppe zugeordnet und sind verantwortlich für die Hintergrundleitfähigkeit von  $K^+$  (*background conductance of  $K^+$* ) (Schmitt et al. 2014).

Bezugnehmend auf die Elektrophysiologie am Herzen weisen einige der genannten  $K^+$ -Kanaltypen übereinstimmende Funktionen bei der Generierung eines Aktionspotentials auf. Einerseits wird dies als funktionale Redundanz diskutiert, andererseits kann es auch als myokardiale Reserve interpretiert werden (Jeevaratnam et al. 2018).

### 1.3.2 Mitochondriale $K^+$ -Kanäle

Neben dem Sarkolemma befinden sich  $K^+$ -Kanäle an den subzellulären Membranen der Kardiomyozyten insbesondere dem Nukleus, sarkoplasmatischen Retikulum und Mitochondrium (Grandi et al. 2017). Im nachfolgenden Abschnitt sollen die mitochondrialen  $K^+$ -Kanäle näher beleuchtet werden, da diesen eine besondere Bedeutung bei der zellulären Antwort auf I/R-induzierten Stress zukommt.

Zahlreiche Stoffwechselreaktionen finden im Mitochondrium statt wie z. B. die ATP-Bildung im Rahmen der Zellatmung. Mindestens 90 % des kardiomyozytären Gesamtbedarfs an ATP werden vom Mitochondrium erzeugt (Murphy et al. 2016). Für die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung ist eine intakte Ionenhomöostase und ein stabiles inneres mitochondriales Membranpotential von -180 mV bis -240 mV bedeutsam. Eine Störung dieser Balance trägt wesentlich zur mitochondrialen Dysfunktion und letztlich zur Entstehung einer kontraktile Störung und HI bei (Singh 2021). Um den physiologischen Ionenhaushalt zu regulieren, ist das Mitochondrium mit unterschiedlichen Ionentransportern ausgestattet. Zu diesen zählen auch die mitochondrialen  $K^+$ -Kanäle, wie der mitochondriale ATP-sensitive  $K^+$ -Kanal ( $mitoK_{ATP}$ ), der  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanal mit hoher (BK) oder geringer Leitfähigkeit (SK)

sowie der  $K_{2P}$ -Kanal TASK3 und die spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle  $K_v1.3$ ,  $K_v1.5$  und  $K_v7.4$  (Singh 2021).

Wie bereits unter 1.2.1 ausgeführt, ist die mitochondriale Dysfunktion u. a. ursächlich für das Entstehen myokardialen I/R-Schadens. Die pathophysiologische Entgleisung des Energiestoffwechsels (ATP-Verarmung), oxidativer Stress durch eine übermäßige ROS-Bildung (z. B. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl-Radikale ( $HO\cdot$ ), Peroxinitrit-Anionen ( $ONOO^-$ )), die  $Ca^{2+}$ -Überladung in der Mitochondrienmatrix und die mPTP-Öffnung sind nennenswerte pathophysiologische Prozesse am Mitochondrium, die den Verlust der myozytären Zellviabilität bei I/R zu verantworten haben (Kuznetsov et al. 2019). Den mitochondrialen  $K^+$ -Kanälen wird eine kardioprotektive Schutzfunktion via  $K^+$ -Influx in die Matrix zugesprochen, die dem pathophysiologischen Geschehen entgegenwirkt (Garlid & Paucek 2003). Beispielsweise verhindert die  $K^+$ -Akkumulation via BK oder  $mitoK_{ATP}$  einen übermäßigen  $Ca^{2+}$ -Influx und führt zu einer kontrollierten Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. Dies stimuliert ein mildes Entkoppeln der ETC und resultiert in einer moderate ROS-Produktion (gemilderter oxidativer Schaden) (Lukowski et al. 2021).

Der mitochondriale Kanal  $mitoK_{ATP}$  zählen zu den meist untersuchten  $K^+$ -Kanälen mit kardioprotektiven Eigenschaften. So wurde schon früh eine Reduktion des ursprünglichen I/R-Schadens durch Verwendung von verschiedenen  $K_{ATP}$ -Aktivatoren wie Cromakalim, Pinacidil oder Nicorandil nachgewiesen (Gross et al. 1987; Grover et al. 1989). Erst in den Folgejahren etablierte sich eine differenzierte Betrachtung zwischen  $K_{ATP}$  am Sarkolemm und  $mitoK_{ATP}$  am Mitochondrium. Durch Administration selektiver Modulatoren wie dem Aktivator Diazoxid bestätigte sich ein  $mitoK_{ATP}$ -vermittelter Herzschutz (Garlid et al. 1997; Korge et al. 2002; Sato et al. 2000). Die Aktivierung von  $mitoK_{ATP}$  unterliegt einem komplexen endogenen Mechanismus, der auch durch iPre (siehe 1.2.2.2) angestoßen wird. Konsequenterweise bewirkte die pharmakologische Administration selektiver  $mitoK_{ATP}$ -Inhibitoren wie 5-HD und Glibenclamid eine Inhibition des iPre-vermittelten Herzschutzes (Garlid et al. 2003; O'Rourke 2004). Die molekulare Identität des Kanals wurde erst kürzlich von Paggio et al. präsentiert. Die Wissenschaftler identifizierten einen mitochondrialen Proteinkomplex mit  $mitoK_{ATP}$ -entsprechender  $K^+$ -Leitfähigkeit, der sich aus einer Kanalpore-formenden Untereinheit MITOK (CCDC51) und der ATP-bindenden Untereinheit MITOSUR (ABCB8) zusammensetzt. Die Deletion von MITOK im Mausmodell (MITOK-KO) bewirkte erwartungsgemäß trotz pharmakologischer Präkonditionierung mit Diazoxid keine Infarktgrößenreduktion *in vivo* (Paggio et al. 2019).

Neben  $mitoK_{ATP}$  wurde auch BK als C-terminale *splice*-Variante DEC (benannt nach den terminalen drei Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Cystein) in kardialen Mitochondrien an der IMM identifiziert (Singh et al. 2013). In einer *ex vivo* Studie an isolierten Meerschweinchenherzen zeigte sich durch BK-Blockade mittels Paxillin eine übermäßige Infarzierung und kontraktile Dysfunktion infolge der Induktion einer globalen I/R (Stowe et al. 2017). Im Tiermodell resultierte durch Deletion des kardiomyozytären BK-Kanals (CMBK-KO) eine pathophysiologisch erhöhte Vulnerabilität nach I/R *in vivo*. Zudem bestätigte sich, dass BK ein weiteres Schlüsselprotein in der komplexen Signalkaskade der mechanischen Konditionierung von iPre und iPost sowie ein wichtiges Effektorprotein der GC/cGMP/cGKI-Signalachse ist (Frankenreiter et al. 2017).

## 1.4 Na<sup>+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>Na</sub>)

K<sup>+</sup>-Kanäle lassen sich anhand ihrer porenformenden  $\alpha$ -Untereinheit in unterschiedliche strukturelle Familien einordnen (Gonzalez et al. 2012). Man unterscheidet zwischen den Kir-Kanälen mit zwei Transmembrandomänen (TMD), den K<sub>2P</sub>-Kanälen mit vier TMD und den K<sup>+</sup>-Kanälen mit sechs TMD (bzw. sieben TMD), zu denen die spannungssensitiven K<sub>V</sub>-Kanäle, die Ca<sup>2+</sup>-aktivierten SK-Kanäle und die Slo-K<sup>+</sup>-Kanäle zählen. Die letztgenannte Gruppe beinhaltet den Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Slo1-Kanal (*aka* BK, maxi-K, K<sub>Ca</sub>1.1, KCNMA1), den pH-sensitiven Slo3-Kanal (*aka* K<sub>Ca</sub>5.1, KCNU1) und die beiden Na<sup>+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>Na</sub>) Slo2.1 (*aka* Slack, K<sub>Na</sub>1.2, KCNT2) und Slo2.2 (*aka* Slack, K<sub>Na</sub>1.1, KCNT1). Die Slo-Kanäle zeichnet sich durch ihre einzigartige Fähigkeit aus, auf Veränderungen des intrazellulären Ionenhaushalts (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>) zu reagieren.

### 1.4.1 Identifikation der K<sub>Na</sub>-Kanäle

Na<sup>+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>-Ströme (I<sub>K<sub>Na</sub></sub>) wurden erstmals an isolierten Kardiomyozyten des Meer-schweinchens beschrieben (Kameyama et al. 1984). Mittels *Patch-Clamp* Messungen wurden K<sup>+</sup>-Ströme mit hoher Leitfähigkeit (207 ± 19 pS) detektiert. Für die Aktivierung dieser Kanäle benötigte es eine [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, die außerhalb des physiologischen Bereich lag (EC<sub>50</sub> = 66 mM). Außerdem zeigte sich die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit unabhängig der vorliegenden [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und ohne relevante spannungsabhängige Kinetik. In den Folgejahren konnten I<sub>K<sub>Na</sub></sub> wiederholt bei der elektrophysiologischen Untersuchung neuronaler Zelltypen beobachtet werden (Dryer 1994; Haimann et al. 1990; Safronov & Vogel 1996). Infolge einer Aktivierung neuronaler K<sub>Na</sub>-Kanäle bei einer EC<sub>50</sub> von ca. 30 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> wurden K<sup>+</sup>-Ströme bis 170 pS gemessen (Bader et al. 1985; Dryer et al. 1989). Physiologisch werden solch hohe [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> von 40 - 100 mM wahrscheinlich lokal begrenzt und kurzfristig nur im neuronalen System erreicht (Rose & Konnerth 2001), was u. a. auch die Expressionsdichte der K<sub>Na</sub>-Kanäle in Neuronen begründen könnte (Bhattacharjee et al. 2002; Bhattacharjee & Kaczmarek 2005). Basierend auf dieser Datenlage wurden verschiedene Hypothesen formuliert, die eine physiologische Bedeutung der K<sub>Na</sub>-Kanäle für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit, die Modulation eines Aktionspotentials und die Reaktionsfähigkeit erregbarer Zellen bei Hypoxie und Ischämie postulieren (Dryer 1994).

Die Bezeichnung „*sequence like a calcium-activated potassium channel*“ (Slack) wurde erstmals bei der Charakterisierung eines K<sub>Na</sub>-Kanals durch Joiner et al. im Jahr 1998 eingeführt. Für die molekulare Identifikation des Slo-Genfamilienmitglieds machten sich die Wissenschaftler die Signatursequenz in der Porenregion der  $\alpha$ -Untereinheit von K<sup>+</sup>-Kanälen zunutze. Die hochkonservierte Aminosäureabfolge TXXTXGYG wird für die K<sup>+</sup>-Selektivität der Kanälen verantwortlich gemacht (Heginbotham et al. 1994). In Übereinstimmung mit dieser Signatursequenz konnte zunächst ein Gen aus dem Genom von *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) mit hoher Homologie zu Slo1 identifiziert werden. Das prognostizierte Translationsprodukt diente als Matrize zur Auffindung eines homologen humanen *expressed sequence tags* (EST) in der Datenbank GenBank® (Teil der *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC)). Mithilfe der identifizierten humanen cDNA konnte zuletzt die Slack-cDNA aus dem Rattenhirn isoliert und kloniert werden. Der anschließende Vergleich

der Aminosäuresequenzen der Vertreter der Slo-Genfamilie zeigte eine Übereinstimmung von nur 7 % zwischen Slack und den K<sup>+</sup>-Kanälen Slo1 und Slo3 (Joiner et al. 1998). Die ersten Untersuchungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von Slack wurden nach Expression in *Xenopus* Oozyten und Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zellen) durchgeführt. Im [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-freien Milieu zeigte der isolierte Kanal einen geringen K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom von 25 - 65 pS. Außerdem wurde die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals durch Veränderungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (≥ 1 μM) reversibel inhibiert. Die Aktivierbarkeit durch [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> oder [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> wurde in dieser Studie zunächst nicht untersucht. Bei der Co-Expression von Slack und Slo1 in *Xenopus* Oozyten konnte zudem eine Heteromultimer-Bildung der Proteine beobachtet werden. Das Slack/Slo1-Hybrid repräsentierte einen neuartigen Ca<sup>2+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit (60 - 180 pS), der sich funktional von Slack und Slo1 unterschied (Joiner et al. 1998).

Weitere Klonierungsarbeiten folgten im Jahr 2000 von Yuan et al. In ähnlicher Herangehensweise wurde das *slo2*-Gen von *C.elegans* isoliert und in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Aminosäuresequenz des als Slo2 bezeichneten Ionenkanals stimmte zu 41 % mit der Sequenz des Säuger-orthologen Proteins Slack (Joiner et al. 1998) überein. Elektrophysiologische Messungen an Slo2 demonstrierten erstmals einen Ca<sup>2+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-sensitiver K<sup>+</sup>-Kanal, denn die Zunahme der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> führte zu einer gesteigerten Kanalaktivität (Yuan et al. 2000). Im Gegensatz zu Slo2 aus *C.elegans*, identifizierten Yuan et al. 2003 einen [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-abhängigen Aktivierungsmechanismus für den Säuger-orthologen K<sup>+</sup>-Kanal (Joiner et al. 1998), der für die *Patch Clamp*-Untersuchungen erneut in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimiert wurde. Der ursprünglich von Joiner et al. als Slack betitelte K<sup>+</sup>-Kanal wurde fortan als rSlo2 bezeichnet. Die gemessenen elektrophysiologischen Eigenschaften von rSlo2 im Rahmen dieser Studie (Yuan et al. 2003) zeigten große Ähnlichkeit zu dem bereits beschriebenen Charakter von I<sub>KNa</sub> im nativen Gewebe wie z.B. die Na<sup>+</sup>-Sensitivität, die hohe K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit (88 - 165 pS) und die variablen Offenzustände des Kanals (Dryer et al. 1989; Haimann et al. 1990; Safronov & Vogel 1996). Die Na<sup>+</sup>-abhängige Aktivierbarkeit von rSlo2 konnte durch die Anwesenheit von [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> synergistisch beeinflusst werden (Yuan et al. 2003). Beispielsweise lag die EC<sub>50</sub> von [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> bei ca. 70 mM bei einer physiologischen [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> von 10 mM, die bei [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Zunahme (160 mM) auf 15 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> abnahm. Da unter ischämischen Bedingungen auch eine [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>-Anreicherung stattfindet, könnte der Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Synergismus eine Slack-Aktivierung unter Ischämie/Hypoxie begünstigen. Im Gegensatz dazu hatte der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Gehalt unter Anwesenheit von [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> keinen Einfluss auf die Kanalaktivität (Yuan et al. 2003).

Durch das *Screening* einer Mausgenom-Datenbank wurde anhand der hohen Übereinstimmungsrate (96 %) mit der Aminosäuresequenz von rSlo2 das orthologe Gen *mSlo2.2* (Slack) entdeckt (Yuan et al. 2003). Zusätzlich wurde ein zweites paraloges Gen *mSlo2.1* identifiziert, das für den K<sub>Na</sub>-Kanal Slick (*sequence like an intermediate conductance K<sup>+</sup> channel*) codiert und ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften zu Slack aufweist. In einer vergleichenden Studie von Bhattacharjee et al. 2003 erfolgte eine elektrophysiologische Charakterisierung der K<sub>Na</sub>-Kanäle Slack und Slick (siehe Tabelle 1.2). Dafür wurden die Gene *Slo2.1* und *Slo2.2* aus dem Gehirn der Ratte kloniert und in CHO-Zellen heterolog exprimiert. Beide Slo2-Kanäle demonstrierten eine Na<sup>+</sup>-abhängige Aktivierbarkeit und K<sup>+</sup>-

Auswärtsrektifizierung, die durch Cl<sup>-</sup> moduliert werden konnte. Durch eine zusätzliche ATP-Bindungsstelle am C-Terminus scheint Slick zudem durch intrazelluläres ATP inhibiert zu werden und ähnelt damit funktional den K<sub>ATP</sub>-Kanälen. Trotz der strukturell hohen Homologie in der Aminosäuresequenz (74 %) von Slack und Slick zeigten sich funktionale Unterschiede zwischen den beiden Slo2-Kanälen, die nachfolgend tabellarisch dargestellt sind (Bhattacharjee et al. 2003).

**Tabelle 1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften von Slack und Slick nach Bhattacharjee et al. 2003**

Elektrophysiologisch relevante Eigenschaft	Slack (Slo2.2)	Slick (Slo2.1)
Ionenselektivität	Selektiv für K <sup>+</sup>	Selektiv für K <sup>+</sup>
K <sup>+</sup> -Flussrichtung (im physiologischen Milieu)	K <sup>+</sup> -Auswärtsrektifizierung	K <sup>+</sup> -Auswärtsrektifizierung
[Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> -Sensitivität	Kanal-aktivierend, EC <sub>50</sub> : 41 mM	Kanal-aktivierend, EC <sub>50</sub> : 89 mM
[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub> -Sensitivität	Kanal-aktivierend, (2x)	Kanal-aktivierend, (5x)
ATP-Sensitivität	Nicht vorhanden	Kanal-inhibierend
K <sup>+</sup> -Leitfähigkeit	183 ± 3 pS	141 ± 3 pS
Aktivierungskinetik	Spannungsabhängig, zeitverzögert	Spannungsunabhängig, unmittelbar
Kanalaktivität im Na <sup>+</sup> -freien Milieu	Nicht vorhanden	Messbarer Strom
Mittlere Öffnungsdauer (bei 5 mM Na <sup>+</sup> /130 mM Cl <sup>-</sup> )	118 ± 26 ms	7,24 ± 1,4 ms

### 1.4.2 Charakterisierung der K<sub>Na</sub>-Kanäle Slack und Slick

#### Molekulare Eigenschaften

Die Kanalpore der Slo2-Genfamilie entsteht durch die Zusammenlagerung von vier α-Untereinheiten, die einen homotetrameren Kanal selektiv für K<sup>+</sup> bilden (Gonzalez et al. 2012; Salkoff et al. 2006). Eine α-Untereinheit besteht aus 6 TMD, wobei sich die Porenregion mit dem K<sup>+</sup>-Selektionsfilter (*K<sup>+</sup> channel signature sequence*) zwischen Segment S5 und S6 befindet. Im Gegensatz zu BK besitzen Slack und Slick keinen Spannungssensor in Segment S4 und keine zusätzliche S0-Einheit. Somit liegen beide Endtermini der Slo2-Kanäle intrazellulär vor (Abb. 1.6). Strukturelle Unterschiede zwischen Slack und Slick sind v. a. bei der Betrachtung des N-Terminus erkennbar (Bhattacharjee et al. 2003). Die N-terminale Aminosäuresequenz für Slack ist nahezu doppelt so lang im Vergleich zu Slick.

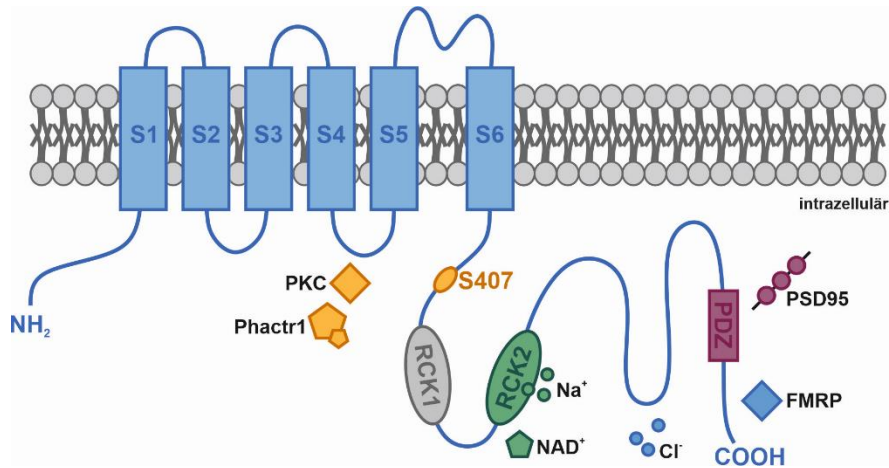
Durch den charakteristisch langen C-Terminus, welcher verschiedene regulatorische Bindungsmotive enthält, sind die Slo2-Kanäle mit zusätzlichen Eigenschaften ausgestattet. In *C.elegans* wird Slo2 durch [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> aktiviert (Yuan et al. 2000), die Kanalaktivierung von Slack und Slick in Säugetieren findet durch [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> statt (Bhattacharjee et al. 2003). Das C-terminale Ende der Slo2-Kanäle beinhaltet zwei *regulator of conductance of potassium* (RCK)-Domänen, die bereits für den Slo1-Kanal BK identifiziert wurden (Jiang et al. 2001). Die

Na<sup>+</sup>-Sensitivität von Slack und Slick wird durch ein Koordinationsmotiv DX(R/K)XXH im Bereich der RCK2 vermittelt (Thomson et al. 2015; Zhang et al. 2010). Nach heterologer Expression in CHO-Zellen wurden die EC<sub>50</sub>-Werte für die Na<sup>+</sup>-abhängige Aktivierung von Slack (41 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) und Slick (89 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) bei 30mM [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> erfasst (Bhattacharjee et al. 2003). Diese Richtwerte können jedoch in der intakten Zelle durch Anwesenheit weiterer Faktoren, wie z. B. NAD<sup>+</sup> verändert sein (Tamsett et al. 2009). Zudem kann die Aktivierbarkeit der K<sub>Na</sub>-Kanäle durch [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> synergistisch verstärkt werden, eine alleinige Kanalaktivierung durch Cl<sup>-</sup> findet jedoch nicht statt. Die Cl<sup>-</sup>-Sensitivität scheint zumindest für Slo2 in *C.elegans* durch die C-terminale, positiv geladene *chloride bowl* zustande zu kommen (Yuan et al. 2000).

Eine weitere funktionale Sequenz am C-Terminus von Slack und Slick ist das *postsynaptic density 95/disc large/zona occludens* (PDZ)-Bindungsmotiv, das bereits für andere K<sup>+</sup>-Kanäle wie z. B. K<sub>v</sub>-Kanäle oder Kir-Kanäle identifiziert wurde. Die Interaktion zwischen Aminosäuren des PDZ-Bindungsmotivs von Slack und der ersten PDZ-Domäne des *postsynaptic density 95* (PSD-95) Proteins scheint die Anreicherung von Slo2/PSD95-Komplexen in der postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen zu initiieren (Uchino et al. 2003).

Wie bereits erwähnt, besitzt Slick im Gegensatz zu Slack ein ATP-Bindungsmotiv in der Nähe der RCK2, das dem Kanal einen zusätzlichen K<sub>ATP</sub>-ähnlichen Charakter verschafft (Bhattacharjee et al. 2003). Diese Eigenschaft führte zu der Annahme, dass Slick an den metabolischen Zustand der Zelle gekoppelt ist. Erst kürzlich zeigte sich in Slick KO-Tieren eine Beeinträchtigung des myokardialen Fettstoffwechsels (der  $\beta$ -Oxidation) bei hohem Energiebedarf (Smith et al. 2018). Der metabolische Phänotyp wurde mutmaßlich auf die Deletion des mitochondrialen Slick-Kanals in Kardiomyozyten zurückgeführt.

In der Literatur ist eine Vielzahl zytoplasmatischer Signalproteine (z. B. GPCR, PKA und FMRP) beschrieben, die durch Wechselwirkung mit dem C-Terminus der K<sub>Na</sub>-Kanäle eine funktionale Veränderung des K<sup>+</sup>-Stroms bewirken (Bausch et al. 2018; Brown et al. 2010; Kaczmarek 2013; Nuwer et al. 2010). Santi et al. entdeckten beispielsweise unter Verwendung des PKC-Aktivators Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) entgegengesetzte Effekte auf den K<sup>+</sup>-Stromfluss der K<sub>Na</sub>-Kanäle. Während die C-terminale Modulation von Slick via PKC die ursprüngliche K<sup>+</sup>-Stromamplitude um ca. 50 % reduzierte, bewirkte die PKC-vermittelte Phosphorylierung des Serin-Rests S407 in der *hinge*-Region zwischen S6 und RCK1 von Slack eine gesteigerte K<sup>+</sup>-Stromamplitude (Barcia et al. 2012; Santi et al. 2006). Inhibitorische Effekte auf den K<sup>+</sup>-Stromfluss von Slack wurden bei der Wechselwirkung des zytoplasmatischen C-Terminus mit dem neuronal-exprimierten Signalprotein Phactr1 (*phosphatase and actin regulator 1*) beobachtet. Auch dieser Effekt scheint über die PKC-Phosphorylierungsstelle an S407 mediiert zu werden, da eine Mutation derselben Position eine Unempfindlichkeit gegenüber Phactr1 zur Folge hatte (Ali et al. 2020; Fleming et al. 2016). Neben der Modulation des K<sup>+</sup>-Stromflusses (*channel gating properties*) werden durch die Bindung zytoplasmatischer Signalproteine weitere *non-conducting* Funktionen vermittelt (Lee et al. 2014). Eine Dysfunktion des C-Terminus von Slack z. B. in Form von hauptsächlich *de novo gain-of-function*-Mutationen scheint mitverantwortlich für die Entstehung humaner Erkrankungen wie Epilepsie, kognitiver Behinderung oder chronischer Herzerkrankung zu sein (Barcia et al. 2012; Kohli et al. 2020).



**Abb. 1.6 Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheit von Slack**

Die  $\alpha$ -Untereinheit des  $K_{Na}$ -Kanals Slack besteht aus 6 Transmembrandomänen S1 - S6 (blau) mit intrazellulärer Lokalisation des N- und C-Terminus. Der C-Terminus beinhaltet die RCK-Domänen RCK1 (grau) und RCK2 (grün), das PDZ-Bindungsmotiv (violett) und die PKC-Phosphorylierungsstelle S407 (orange). Die Kanalaktivität wird maßgeblich durch  $[Na^+]_i$  (grün) moduliert. Weitere Liganden, darunter  $NAD^+$  (grün) an der RCK2, PSD95 (violett) am PDZ-Bindungsmotiv und PKC (orange) bzw. Phactr1 (orange) an S407, sind farblich korrespondierend dargestellt. Bislang unbekannt sind die C-terminale Interaktionsdomänen für FMRP (blau) und  $Cl^-$  (blau). Das Schema wurde modifiziert nach (Kaczmarek 2013). FMRP: *Fragile X mental retardation 1 protein*,  $NAD^+$ : Nicotinamidadenin-dinukleotid, PDZ: *postsynaptic density 95/disc large/zona occludens*, Phactr1: *Phosphatase and actin regulator 1*, PKC: *Proteinkinase C*, PSD95: *postsynaptic density 95*, RCK: *regulator of conductance of  $K^+$* , S407: Serin 407.

### Elektrophysiologische Eigenschaften

Nach heterologer Expression von Slack und Slick in CHO-Zellen zeigte sich bei symmetrischer  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_i = [K^+]_{ex}$ ) von 130 mM eine einheitliche  $K^+$ -Leitfähigkeit von 180 pS für Slack und eine leicht reduzierte  $K^+$ -Leitfähigkeit von 140 pS für Slick (Bhattacharjee et al. 2003). Beide Kanäle wiesen neben ihrem vollständigen Offenzustand verschiedene Zwischenzustände mit kleineren Leitfähigkeiten auf. Unter physiologischen Bedingungen ist die Slack vermittelte  $K^+$ -Auswärtsrektifizierung gering, nimmt jedoch durch Depolarisation der Zelle zu. Da keine geladenen Aminosäurereste als Spannungssensor in S4 vorliegen, ist die beobachtete geringe Spannungssensitivität des Kanals bislang unverstanden (Kaczmarek 2013). Eine geringe Spannungsaktivität ist auch für Slick beschrieben (Santi et al. 2006). Die kinetischen Eigenschaften von Slack variieren in Abhängigkeit der vorliegenden Isoform. Es sind fünf verschiedene murine Slack-Isoformen bekannt, deren Gen-Transkripte das Resultat alternativen Spleißens sind (Brown et al. 2008). Unter diesen sind die Isoformen Slack-A und Slack-B funktional charakterisiert worden. Der von Joiner et al. 1998 erstmals beschriebene Slack-Kanal (rSlo2) entspricht der Slack-B-Isoform mit einer verzögerten Aktivierungskinetik und langem Offenzustand. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die Slack-A-Isoform durch ein sehr rasches Aktivierungsverhalten aus, das dem von Slick ähnelt. Prinzipiell ist der Slack- $K^+$ -Strom jedoch nur unter Anwesenheit von  $[Na^+]_i$  messbar. Slick- $K^+$ -Ströme konnten dagegen auch bei  $Na^+$ -Abwesenheit detektiert werden (Bhattacharjee et al. 2003; Yuan et al. 2003). Neben der Ausbildung homotetramerer Kanäle sind die Slack- und Slick- $\alpha$ -Untereinheiten befähigt, heteromultimere Proteinkomplexe zu formen, die sich in ihren biophysikalischen

Eigenschaften (z. B. Aktivierungskinetik,  $K^+$ -Leitfähigkeit, Modulation via PKC, Regulation des Zellvolumens) deutlich unterscheiden (Chen et al. 2009; Joiner et al. 1998; Tejada et al. 2017).

### 1.4.3 Physiologische/pathophysiologische Bedeutung von Slack

Aufgrund der hohen  $[Na^+]_i$ , welche zur  $K_{Na}$ -Kanalaktivierung notwendig sind, wurde eine physiologische Rolle von Slack und Slick lange Zeit kontrovers diskutiert. Obwohl ein  $I_{K_{Na}}$  zuerst in Kardiomyozyten entdeckt und beschrieben wurde (Kameyama et al. 1948), ist insbesondere die neuronale Funktion (v. a. des Slack-Kanals) von wissenschaftlichem Hauptinteresse. Dies mag u. a. auf das Expressionsmuster der  $K_{Na}$ -Kanäle zurückzuführen sein. Die immunhistologischen Untersuchungen von Slack und Slick im Gehirn bestätigten eine hohe Kanalexpressionsdichte im ZNS, insbesondere in neuronalen Zellen des olfaktorischen Bulbs, sowie des Mittel- und Kleinhirns (Bhattacharjee et al. 2002; Bhattacharjee et al. 2005; Rizzi et al. 2016). Darüber hinaus konnten Slack-mRNA-Level im Hoden (Yuan et al. 2003) und in der Niere (Paulais et al. 2006) nachgewiesen werden. Für Slick wurde eine Expression außerhalb des neuronalen Bereichs z. B. in uterinen Glattmuskelzellen (Ferreira et al. 2018) oder pankreatischen Gangzellen (Hayashi et al. 2012) gezeigt. Die kardiale Expression von Slack und Slick wurde erstmals von Yuan et al. auf mRNA-Ebene postuliert (Yuan et al. 2003). Weitere Nachweise für die Slick-Expression im Herzen folgten (Bhattacharjee et al. 2003; Martinez-Espinosa et al. 2015). Auf eine Slack-Expression im Herzen konnte zuletzt durch die Veröffentlichung eines Kompendiums des murinen Transkriptoms auf mRNA-Ebene ergänzend hingewiesen werden (Schaum et al. 2018).

Unter physiologischen Bedingungen sind die  $K_{Na}$ -Kanäle an der Regulation der Neuronenaktivität, beispielsweise der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (Haimann et al. 1992; Tamsett et al. 2009) und der Modulation von Aktionspotentialen (Bhattacharjee & Kaczmarek 2005), beteiligt. Die neuronale Aktivität wird durch transiente  $Na^+$ -Ströme initiiert, die durch die Aktivität spannungsabhängiger  $Na_v$ -Kanäle und den ionotropen Glutamatrezeptoren AMPA und NMDA zustande kommen (Rose 2002). Durch den  $Na^+$ -Einstrom werden lokal  $[Na^+]_i$ -Level von 40 - 100 mM erreicht und die Aktivierung von Slack und Slick ermöglicht. Der resultierende  $K^+$ -Efflux bewirkt eine Re- und Hyperpolarisation der Membran und hemmt dadurch eine überschießende Neuronenaktivität. Bei hoher Erregungsfrequenz sind  $K_{Na}$ -Kanäle an der Generierung langsamer Nachhyperpolarisationen (*slow afterhyperpolarization* (AHP)) beteiligt, die die Erregbarkeit der Neurone drosseln und das Aktivitätsmuster verändern (Kim & McCormick 1998; Schwindt et al. 1989).  $K_{Na}$ -Kanäle sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, insbesondere im neuronalen Bereich, beteiligt. Dazu zählen die synaptische Plastizität, die Nozizeption, die Exzitotoxizität und die Epilepsie, die nachfolgend jeweils kurz beschrieben werden.

#### Synaptische Plastizität/Auftreten intellektueller Störungen

Die synaptische Plastizität beschreibt die Fähigkeit von Neuronen, aktivitätsabhängig die synaptische Übertragungsintensität zu modulieren. Diese Eigenschaft ist elementar für kognitive Prozesse wie z. B. Lernen und Gedächtnisbildung (Takeuchi et al. 2014). In *in vivo*

Verhaltensstudien zeigten Slack KO-Mäusen Defizite in lokomotorischen Lernprozessen und der kognitiven Flexibilität (Bausch et al. 2015; Quraishi et al. 2020). Diese beobachteten Auffälligkeiten lassen sich u. a. auf eine beeinträchtigte Plastizität glutamaterger Synapsen im Hippocampus von Slack KO-Tieren zurückführen (Matt et al. 2021). Humane Mutationen des *KCNT1*-Gens sind ursächlich für die Entstehung intellektueller Entwicklungsstörungen, die mit vermindertem IQ (< 70) und Epilepsien einhergehen (Kim & Kaczmarek 2014). Die häufigste Form vererbbarer kognitiver Behinderungen ist das Fragile X Syndrom (FXS), das aufgrund einer *loss-of-function*-Mutation des *fragile X mental retardation proteins* (FMRP) entsteht (Brown et al. 2010). Da FMRP durch C-terminale Interaktion mit Slack zu einer Steigerung der  $K_{Na}$ -Kanalaktivität führt, liegt die Vermutung nahe, dass eine verminderte Slack-Aktivität zur Pathophysiologie von FXS beiträgt (Zhang et al. 2012).

### **Neuropathischer Schmerz/Schmerzwahrnehmung**

Die Schmerzwahrnehmung (Nozizeption) erfolgt durch periphere Stimulation (z. B. mechanisch, thermisch, chemisch) freier Nervenendigungen von afferenten Neuronen (Nozizeptoren) und wird als elektrischer Impuls an das ZNS zur emotionalen Schmerzbewertung geleitet (Basbaum et al. 2009). Neuropathische Schmerzen entstehen durch neuronale Schädigung und eine dadurch bedingte veränderte Ionenkanal-Expression und -Aktivität in afferenten Schmerzfasern, was eine übermäßige Erregbarkeit sensorischer Neuronen verursacht (van Velzen et al. 2020; Waxman & Zamponi 2014). Es liegt eine hohe, ubiquitäre Expression von  $K_{Na}$  in sensorischen Neuronen der Spinalganglien (DRG, *dorsal root ganglia*) vor, die für die Übermittlung peripherer Informationen ans ZNS verantwortlich sind. Aufgrund der beobachteten  $K_{Na}$ -abhängigen Modulation der Erregungsfrequenz in DRG wird eine nozizeptive Funktion für Slack und Slick postuliert (Nuwer et al. 2010; Tamsett et al. 2009; Tomasello et al. 2017). *In vivo*-Untersuchungen zum neuropathischen Schmerzverhalten in globalen Slack KO und DRG-Neuron-spezifischen Slack KO-Mäusen bestätigten ein gesteigertes Schmerzempfinden der KO-Tiere gegenüber WT-Kontrolltieren (Lu et al. 2015). Aktuelle Studien von Lu, Schmidtko et al. enthüllten zelluläre Prozesse unter Beteiligung von Slack und Slick, die zur komplexen Modulation der Nozizeption (z. B. in Zusammenspiel mit TRPA1 oder  $P_2X_3$ ) beitragen (Flauaus et al. 2022; Lu et al. 2021; Zhou et al. 2022).

### **Exzitotoxizität**

Exzitotoxische neuronale Schädigungen werden durch eine exzessive und andauernde Stimulation glutamaterger Rezeptoren (AMPA- und NMDA-Rezeptoren) durch exzitatorische Neurotransmitter (z. B. Glutamat) provoziert (Gillessen et al. 2002; Olney 1989). Die Glutamat-Akkumulation im synaptischen Spalt ist verantwortlich für nekrotische und apoptotische Zelltodmechanismen. Diese Form der neuronalen Schädigung ist bei neurodegenerativen Erkrankungen oder Schlaganfall/zerebellärer Ischämie zu beobachten und pharmakologisch bislang kaum behandelbar (Albensi et al. 2004).  $K^+$ -Kanäle, darunter Slack als wesentlicher Regulator neuronaler Erregbarkeit, werden als protektive Gegenspieler exzitotoxischer Vorgänge diskutiert. Nanou et al. zeigten, dass die AMPA-Rezeptor-vermittelte exzitatorische synaptische Transmission durch einen  $K^+$ -Efflux via Slack inhibiert werden konnte. Infolge des AMPAR-induzierten  $Na^+$ -Einstrom werden Slack-Kanäle aktiviert, die durch ihre Aktivität im

Sinne eines negativen *feedback*-Mechanismus die weitere AMPAR-vermittelte Exzitation inhibieren (Nanou et al. 2008). Untersuchungen an Slack KO-Mäusen *in vivo* und isolierten zerebellären Granularzellen *in vitro* bestätigen eine neuroprotektive Funktion von Slack im Rahmen von NMDA-induzierten, exzitotoxischen Prozessen (Ehinger et al. 2021). Dieser Effekt scheint mechanistisch durch Inhibition der Membrandepolarisation via K<sup>+</sup>-Efflux und Slack-abhängiger, transkriptioneller Regulation der neuroprotektiven *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)/Tyrosinkinase B (TrkB)-Achse vermittelt zu sein.

## Epilepsie

Die pathophysiologisch gesteigerte Erregbarkeit zentraler Neurone führt zu anfallsweise auftretenden Funktionsstörungen des Gehirns (Fisher et al. 2005). Ein solcher epileptischer Anfall geht einher mit abnormen motorischen und vegetativen Reaktionen (Muskelzuckungen, Stürze, Stereotypen) sowie Bewusstseinsveränderungen. Ein unmittelbarer Nachweis der Epilepsie ist mittels Elektroenzephalopathie (EEG) möglich. Das Funktionsdiagramm erfasst die Hirnrindenaktivität und zeigt abnorm veränderte Hirnstromkurven, z. B. durch das Auftreten von Spitzen (*spikes*), Spitze-Welle-Komplexen (*spikes and waves*) oder steilen Wellen (*sharp waves*) (Smith 2005).

Für die Entstehung (idiopathischer) Epilepsien können Mutationen des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors oder Ionenkanal-Mutationen (Kanalopathien) von Na<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Kanäle ursächlich sein. Es stellte sich heraus, dass humane Mutationen des *KCNT1*-Gens eine pathophysiologische Veränderung des I<sub>KNa</sub> mit negativen Konsequenzen für die Entwicklung epileptischer Formen provozieren können (Kim & Kaczmarek 2014). Eine Häufung von Slack-codierenden *KCNT1*-Mutationen zeigte sich in Epilepsie-Patienten, die an einer juvenilen, sogenannten infantilen epileptischen Enzephalopathie (*early onset epileptic encephalopathy* (EOEE)) leiden, welche häufig mit intellektueller Beeinträchtigung und Entwicklungsdefiziten einhergehen. Zu den EOEEs zählen beispielsweise die *epilepsy of infancy with migrating focal seizures* (EIMFS, syn. *malignant migrating partial seizures in infancy* (MMPSI)) oder die *autosomal dominant nocturnal front lobe epilepsy* (ADNFLE) (Kawasaki et al. 2017; Kuchenbuch et al. 2019; Moller et al. 2015; Ohba et al. 2015). Anhand von Genomsequenzierungen der Epilepsiepatienten konnte eine Vielzahl verschiedener *KCNT1*-Mutationen aufgedeckt werden, die meist in der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne durch Veränderung einer Aminosäure lokalisiert sind (Quraishi et al. 2020).

Elektrophysiologische *in vitro*-Studien belegten eine gesteigerte Aktivität der mutierten Slack-Kanäle (*gain-of-function-mutation*) (Kim & McCormick 1998). Beispielsweise zeigte sich bei der Aktivierung verschiedener genetisch manipulierter Slack-Kanäle kaum ein Auftreten von *subconductance*-Offenzuständen, sondern meist ein sofortiger Offenzustand mit maximaler K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit. Weitere Slack-Mutationen wiesen einen konstitutiv aktiven Zustand analog einer dauerhaften Phosphorylierung via PKC an Serin 407 auf (Barcia et al. 2012). Hinzu kommen eine mutmaßlich veränderte Spannungssensitivität und Na<sup>+</sup>-Sensitivität in den Slack-Mutanten (Tang et al. 2016). Es existieren also verschiedene Erklärungsansätze, aus denen sich ableiten lässt, wie dysfunktionale bzw. mutierte Slack-Kanäle zur Entstehung epileptischer Anfälle beitragen.

Des Weiteren konnten im Zusammenhang von *KCNT1*-Mutationen an Epilepsiepatienten zusätzliche Funktionsstörungen und morphologische Veränderungen am Herzen beobachtet werden. So scheinen *de-novo* Mutationen des Slack-Gens auch ursächlich für eine pathophysiologische Linksherz-Vergrößerung und arrhythmogene Störung der Erregungsleitung zu sein (Kohli et al. 2020; Moller et al. 2015). Beispielsweise zeigten Patienten, die Träger von *gain-of-function KCNT1*-Allelen waren, eine hypertrophe Veränderung des linken Ventrikels sowie eine HI-ähnliche Dysfunktion (Tachypnoe, Tachykardie) des Myokards (Kawasaki et al. 2017).

#### **1.4.4 Mögliche Relevanz von Slack bei hypoxischen/ischämischen Prozessen am Herzen**

In elektrophysiologischen Messungen waren hohe  $[Na^+]_i$  notwendig, um native  $K_{Na}$ -Ströme zu messen bzw. Slack und Slick im heterologen System zu aktivieren (siehe 1.4.2). Diese Eigenschaft führte schon früh zu der Annahme, dass die  $K_{Na}$ -Kanäle unter pathophysiologischen Bedingungen funktional relevant sind, bei denen es zu einer Entgleisung von  $[Na^+]_i$  kommt (Dryer 1994). Eine übermäßige Akkumulation von  $[Na^+]_i$  ist beispielsweise im Verlauf hypoxischer/ischämischer Prozesse am Herzen zu beobachten, die durch Okklusion eines Herzkranzgefäßes bei MI (siehe 1.1.2.1) ausgelöst werden. Eine gestörte  $[Na^+]_i$ -Homöostase ist eine wesentliche Determinante, die eine Dysfunktion des Myokards verursacht (Coppini et al. 2013) und zu einer irreversiblen I/R-Schädigung des Herzens beiträgt (Imahashi et al. 1999; Iwai et al. 2002). Durch die Ischämie-bedingte  $[Na^+]_i$ -Akkumulation wird beispielsweise die Richtungsumkehr des NCX ausgelöst (siehe 1.1.2.1). Es folgt die zytotoxische Akkumulation von  $[Ca^{2+}]_i$  einhergehend mit nekrotischen und apoptotischen Ereignissen in Kardiomyozyten (Cross et al. 1998; Imahashi et al. 2005).

Um diesen Prozessen entgegenzuwirken, könnte die pathophysiologische  $Na^+$ -Entgleisung jedoch eine Aktivierung  $Na^+$ -sensitiver Slack-Kanäle triggern, die durch gesteigerten  $K^+$ -Ausstrom eine Hyperpolarisation der Plasmamembran und Stabilisierung des Membranpotentials bewirken. Dieses Postulat wurde erstmals von Kameyama et al. 1984 formuliert. Die metabolische Inhibition der Zelle bei Hypoxie bzw. Ischämie führt zu einer adaptiven Modulation der elektrischen Aktivität am Herzen, darunter zu einer Verkürzung der APD (Carmeliet 1978; Isenberg et al. 1983). Dieser Effekt dient der Optimierung (Verminderung) des kardialen Energieverbrauchs und könnte u. a. durch Aktivierung von  $K_{Na}$ -Kanälen zu erklären sein (Mitani & Shattock 1992; Veldkamp et al. 1994). In diesem Sinne konnten auch bei pharmakologischer Inhibition der  $Na^+/K^+$ -ATPase durch Digitalis-Herzglykoside  $Na^+$ -abhängige  $K^+$ -Auswärtsströme detektiert werden (Dryer 1994; Luk & Carmeliet 1990).

Weitere *in vivo* Studien an Nematoden deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den  $K_{Na}$ -Kanälen und ischämischen Prozessen hin (Wojtovich et al. 2011; Yuan et al. 2003). Nematoden unterscheiden sich von Säugern dadurch, dass ihr Genom nur ein *Slo2*-Gen beinhaltet. Durch Deletion des Säuger-orthologen *Slo2*-Gens in *C.elegans* zeigten diese ein hypersensitives Verhalten gegenüber hypoxischen Bedingungen (Yuan et al. 2003). Nach einer 16-stündigen Inkubationsphase in einer Hypoxiekammer unter  $O_2$ -Depletion starben

darüber hinaus signifikant mehr Slo2-Mutanten ( $86 \pm 2 \%$ ) als WT-Kontrollen ( $58 \pm 6 \%$ ). Untersuchungen an in *Xenopus* Oozyten exprimierten Slack-Kanälen bestätigten eine  $\text{Na}^+$ -abhängige Kanalaktivierung unter Ischämie-ähnlichen Bedingungen, d. h. einer übermäßigen  $[\text{Na}^+]_i$  von 45 mM und vorherrschender intrazellulärer Azidose von pH 6,3 (Ruffin et al. 2008). Im Gegensatz dazu führten dieselbe  $[\text{H}^+]_i$ -Akkumulation und der  $\text{CO}_2$ -Anstieg bei zeitgleich physiologischen  $[\text{Na}^+]_i$ -Leveln von 5 mM jedoch zu einer reduzierten Offenwahrscheinlichkeit des Slack-Kanals. Dies bestärkt die Annahme einer funktionalen Relevanz in Abhängigkeit der zytotoxischen  $\text{Na}^+$ -Akkumulation im pathophysiologischen Modell (Ruffin et al. 2008). Wojtovich et al. postulierten ebenfalls eine protektive  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Funktion unter Ischämie, denn in Slo2-defizienten Nematoden konnten keine APC-vermittelten Effekte *in vivo* beobachten werden (Wojtovich et al. 2011). Unter hypoxischen Bedingungen wurden WT und *Slo2-loss-of-function*-Mutanten mit dem VA Isofluran präkonditioniert. Während die Präkonditionierung zu einer deutlich verminderten Sterberate der WT-Nematoden führte, zeigte sich kein protektiver Effekt in Slo2-defizienten Fadenwürmern. Die Wiedereinführung des nativen *Slo2*-Gens konnte *vice versa* die APC-induzierte Protektion in den *Slo2*-Mutanten wiederherstellen. Im murinen Modell bestätigte sich der Slick-Kanal als Mediator der volatilen Präkonditionierung (Wojtovich et al. 2016). *Ex vivo* Langendorff-perfundierte Herzen von globalen Slick KO- und Slick/Slack DKO-Mäusen präsentierten nach APC ein unverändert großes Ausmaß globaler I/R-Schädigung am Myokard. Analog zu den WT-Kontrollherzen führte die globale Deletion von Slack zu keiner Beeinträchtigung des APC-vermittelten Herzschutzes. APC unterliegt einer komplexen Signaltransduktion (siehe 1.2.2.3) unter Beteiligung diverser iPre-relevanter Effektoren (z. B. PKC, Adenosin, NO). Übereinstimmung herrscht bei der Annahme, dass der kardioprotektive Effekt dieser Signalkaskaden auf Ebene der Mitochondrien stattfindet (Redel et al. 2008; Wojtovich et al. 2011). Durch den Einsatz von Thallium ( $\text{Tl}^+$ ) als  $\text{K}^+$ -Surrogat konnte der  $\text{K}^+$ -Ionenfluss an der Zell- und Organellmembran analysiert werden (Wojtovich et al. 2016). Nach der Stimulation mit Isofluran bestätigte sich ein VA-induzierter  $\text{K}^+$ -Fluss am Sarkolemm und an der Mitochondrienmembran isolierter WT-Kardiomyozyten, der jedoch nicht in Slick KO-Proben detektierbar war. Unveränderte  $\text{K}^+$ -Flux-Messungen an isolierten Slack KO-Mitochondrien stärken die Annahme einer APC-vermittelte Kardioprotektion via (mitochondrialem) Slick-Kanal (Smith et al. 2017). Die VA-induzierte  $\text{K}^+$ -Dynamik an der Plasmamembran von Slack KO-Kardiomyozyten wurde jedoch nicht untersucht (Wojtovich et al. 2016).

## 1.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Ischämische Herzerkrankungen zählen zu den führenden Ursachen für Morbidität und Sterblichkeit (Wilkins et al. 2017). Der akute MI geht einher mit dem plötzlichen Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien, was innerhalb von kurzer Zeit zu einer irreversiblen Schädigung des unterversorgten Infarktareals führt (Thygesen et al. 2018). Aufgrund der Unvorhersehbarkeit dieses Ereignisses ist die Dauer der Ischämie ein entscheidender Prognosefaktor für die Überlebenschancen der MI-Patienten. Die bislang einzige Therapiemöglichkeit ist die schnellstmögliche Wiedereröffnung des okkludierten Koronargefäßes. Es mangelt an zusätzlichen pharmakologischen Strategien, mit denen die Progredienz der Myokardschädigung während der Infarktzeit gedämpft werden könnte. Zusätzlich wird das Myokard durch die Blutflusswiederherstellung im Rahmen der Reperfusionenmaßnahme weiter geschädigt. Präklinische Studien am Tiermodell zeigten, dass eine Senkung des I/R-Schadens durch volatile oder mechanische Konditionierungsstrategien am Herzen möglich ist. Jedoch verlief die klinische Translation dieser Techniken bislang nur mit geringem Erfolg (Hausenloy & Yellon 2013). Umso notwendiger wird die Erforschung kardioprotektiver Signalkaskaden am Herzen und die Identifikation neuer Zielstrukturen als Grundlage für die Entwicklung neuer pharmakologischer Strategien.

Kardiale K<sup>+</sup>-Kanäle spielen eine wichtige Rolle für die physiologische Myokardfunktion, beispielsweise sind sie an der Regulation des Ruhemembranpotentials und an der Gestaltung der Erregungsleitung beteiligt (Grant 2009). Neben ihrer K<sup>+</sup>-leitenden Funktion können K<sup>+</sup>-Kanäle auch mit intrazellulären Signalmolekülen interagieren (Lee et al. 2014). Am Herzen könnte eine Aktivierung distinkter K<sup>+</sup>-Kanäle pathophysiologische Ereignisse limitieren und somit letztlich vor MI schützen. Exemplarisch ist in diesem Zusammenhang der mitochondrial lokalisierte BK-Kanal zu nennen, der als Effektorprotein des GC/cGMP/cGKI-Signalwegs zu einem effektiven Herzschutz bei I/R infolge der mechanischen Konditionierung beiträgt (Frankenreiter et al. 2017). Ebenfalls von großer Bedeutung für zahlreiche nicht-/pharmakologische Interventionen der Kardioprotektion ist der K<sup>+</sup>-Kanal mitoK<sub>ATP</sub> (Costa & Garlid 2008). Durch iPre-vermittelte Aktivierung des RISK-Signalwegs moduliert mitoK<sub>ATP</sub> beispielsweise den Erhalt der mitochondrialen Integrität unter ischämischen Bedingungen.

Seit der Identifikation Na<sup>+</sup>-sensitiver K<sup>+</sup>-Ströme wird auch für Slack eine protektive Funktion unter Hypoxie/Ischämie postuliert (Dryer 1994; Kameyama et al. 1984). Ausschlaggebend dafür ist die hohe [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (EC<sub>50</sub>: 40 mM), die zur Aktivierung des Kanals notwendig ist (Bhattacharjee et al. 2003). Meist werden derart hohe [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Level nur unter pathophysiologischen, insbesondere ischämischen Bedingungen wie z. B. einem MI erreicht. Der im Rahmen dieses Ereignisses auftretende akute Gefäßverschluss führt zunächst zu einer O<sub>2</sub>-Unterversorgung und einem verminderten CO<sub>2</sub>-Abtransport im okklusionsbetroffenen Areal (Ferdinandy et al. 2007). Die Laktatakkumulation, respiratorische Azidose und ATP-Depletion kennzeichnen die anaerobe Stoffwechsellage der Zelle. Aufgrund der intrazellulären H<sup>+</sup>-Akkumulation und pH-Verschiebung (< 7,0) wird der NHE aktiviert, was die Akkumulation intrazellulärer Na<sup>+</sup>-Ionen zur Folge hat. Zusätzlich verursacht auch der Funktionsverlust der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und die Aktivierung der Na<sub>v</sub>-Kanäle eine zytotoxische [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. Außerdem provozieren der Ca<sup>2+</sup>-Influx via Ca<sub>v</sub>-Kanäle und der NCX in *reverse*-Konfiguration die

übermäßige Anreicherung von  $[Ca^{2+}]_i$ , was letztlich zum Zelltod der Kardiomyozyten führt. Die  $Na^+$ -abhängige Aktivierung des Slack-Kanals könnte infolge der zytotoxischen Anreicherung von  $[Na^+]_i$  in der ischämischen Phase einen massiven  $K^+$ -Efflux bewirken und somit zu einer Re- und Hyperpolarisation der Plasmamembran sowie einer Stabilisierung des Membranpotentials führen (Kaczmarek 2013). Bislang berichten Untersuchungen an Nematoden bei Deletion des *Slo2*-Gens über eine erhöhte Vulnerabilität der Mutanten unter hypoxischen Zuständen und ein Ausbleiben der APC-vermittelten Protektion (Wojtovich et al. 2011; Yuan et al. 2003). Fortführende Studien am murinen Modell identifizierten Slick, einen mit Slack eng verwandten  $K_{Na}$ -Kanal mit hoher struktureller und funktionaler Übereinstimmung, als Mediator der APC-stimulierten Signaltransduktion (Wojtovich et al. 2016). Außerdem wurde durch heterologe Expression des Slack-Kanals in *Xenopus* Oozyten eine  $Na^+$ -abhängige Aktivierung des Slack-Kanals unter Ischämie-ähnlichen Bedingungen ( $H^+$ ,  $CO_2$ ) gezeigt (Ruffin et al. 2008). Bislang gibt es jedoch keine Veröffentlichung, die eine potentiell kardioprotektive Funktion des Slack-Kanals am Herzen untersuchte.

Gegenstand der hier vorliegenden Doktorarbeit ist es daher, die Rolle des kardialen Slack-Kanals bei akutem MI *in vivo* zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden globale und Kardiomyozyten-spezifische Slack KO-Tiere sowie deren Kontroll-Wurfgeschwister in unterschiedlichen I/R-Modellen *in vivo* untersucht. Durch zusätzliche volatile und mechanische Konditionierung der Herzen sollte die Bedeutung des kardialen Slack-Kanals in Hinblick auf die komplexe kardioprotektive Signaltransduktion bei I/R analysiert werden. Um gezielt mögliche intrazelluläre Wechselwirkungen zwischen Slack und Herzschutz-relevanten Mediatoren zu untersuchen, wurden der CG-Aktivator Cinaciguat und der  $mitoK_{ATP}$ -Inhibitor 5-HD appliziert. Ergänzende *in vitro* Studien an isolierten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen sowie HEK293-hKCNT1- und HEK293-Surrogatzellen sollten darüber hinaus grundlegende Eigenschaften von Slack bei der Regulation der  $K^+$ -Homöostase aufzeigen. Neben H/R *in vitro* wurde der Slack-Kanal u. a. durch Stimulation mit Nicosamid, einem Slack-Aktivator, aktiviert. Fluoreszenz-basierte Analysen z. B. unter Verwendung der  $K^+$ -Sensoren GEPII sollten den Einfluss von Slack auf  $[K^+]_i$  und das Membranpotential entschlüsseln. Zudem wurde in biochemischer und elektrophysiologischer Herangehensweise die Expression des funktionalen Slack-Kanals am Herzen untersucht.

## 2 Material und Methoden

Allgemeine Laborgeräte, Software und standardmäßig eingesetzte Verbrauchsmaterialien sind in Abschnitt 2.1 gelistet. Eine tabellarische Übersicht der versuchsspezifischen Materialien, chemischen Substanzen und Pufferlösungen ist in den Folgeabschnitten des Kapitels 2 zusammen mit der methodischen Durchführung aufgeführt.

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
Absaugpumpe (Zellkultur)	Membran-Vakuumpumpe, Laboport
Analysenwaage	VWR-124, Sartorius AG
Autoklav	Systec V-55, Systec GmbH Systec V-120, Systec GmbH
Bildtrennungssystem	Optosplit II, Teledyne Technologies Inc.
Brutschrank (Zellkultur)	CB 150, Binder
Brutschrank mit O <sub>2</sub> -Regelung	CB 053, Binder
Detektionssystem (Western Blot)	Amersham Imager 600, GE-Healthcare
Druckkatheter (Blutdruckmessung)	TA11PA-C10, Data Science Int.
Echokardiograph für Kleintiere	Vevo 2100, Visual Sonics
Eismaschine	Brucheismaschine, Ziegra
Elektrodenplatten (Western Blot)	30034507, Scie-Plas
Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Sub-Cell, Bio-Rad
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Mini Protean, Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop (ApoTome)	Zeiss Axioimager Z1, Carl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop (FRET-Messung)	Zeiss Observer Z1, Carl Zeiss
Gelgießapparatur	Bio-Rad
Geldokumentationsanlage	BioDoc Analyze, Biometra
Gewebehomogenisator/Dispergiergerät	Polytron PT 1200E, Kinematica
Heizblock	Thriller Thermo Incubator, Peqlab
Heizplatte mit Temperaturkontrolle	TCAT-2LV Controller, Physitemp
Histologiescanner	Pannoramic Desc, 3D Histech
Kleintierwaage	LS2000H, G&G
Kryotom (Gewebeschnitte)	Microm HM, Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Mikro 220R, Hettich
Langendorff-Perfusionsanlage	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus
LED-Lichtgenerator (FRET-Messung)	LedHUB High-Power LED, Omnicron
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss
Magnetische Heizplatte	Wilovert 30, Hund
Messschieber (Tibiae-Vermessung)	Digital ABS AOS Messschieber, Mitutoyo
Mikroliterspritze	50 µl Modell 705N, Hamilton
Mikroplatten-Photometer (ELISA-Reader)	Tecan Infinite F200 Pro, Tecan
Mikrowelle	MWG 800 FiF
Nanophotometer	P 330, Implen
Narkosegerät mit Isofluran-Vapor	0258-Narkoseeinheit, Völker GmbH
Narkosemaske für Nager mit Absaugsystem	RACPro, Groppler Medizintechnik

<b>Gerät</b>	<b>Gerätetyp, Hersteller</b>
PCR-Thermocycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf
pH-Elektrode	Blue Line 18 pH, Schott
pH-Meter	pH 540 GLP, WTW pH-Meter 761 Calimatic, Knick
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Pipetman, Gilson
Pipettierhilfe	Accu-Jet pro, Brand
Präparationsbesteck	FST
Präzisionswaage	BP 2100 S, Sartorius
Real Time PCR-Cycler	CFX Connect, Bio-Rad
Reinstwasseraufbreitungsanlage	Milli-Q Biocell, Millipore Purelab flex, Elga
Schlauchpumpe	REGLO digital, Ismatec
Schüttler	S20, CAT
Stereolupe (chirurgische Eingriffe)	M80, Leica Microsystems
Stereolupe (Organpräparationen)	EZ5, Leica Microsystems
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Scientific
Stoppuhr	TR118, Oregon Scientific
Strom/Spannungsquelle	EV 231, Consort Standard Power Pack 25, Biometra
Systemkamera	DSC-WX200/SC, Sony
Telemetriesystem	Data Science Int.
Tierhaltungssystem	Luftstromschränke Uniprotect, Bioscape
Trockenschrank	FD 115, Binder
Ventilator für Kleintiere	Minivent Typ 8455, Hugo Sachs Elektronik
Vortexmischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Wärmelampe	Infrarotlampe IL, Beurer
Wasserbad	K10/C10, Thermo Haake TW20, Julabo
Zentrifugen	Mikro 220, Hettich

## 2.1.2 Software

<b>Software</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham Imager 600	Western Blot (Protein-Nachweis)	GE-Healthcare
AxioVision Rel. 4.8	Histologie (Auswertung)	Carl Zeiss
BioDocAnalyze (BDA) gel analysis software	Geldokumentation	Biometra
Bio-Rad CFX Manager 3.1	qRT-PCR (Quantifizierung)	Bio-Rad
CaseViewer	Histologie (Visualisierung)	3D Histech
CoreIDRAW 2021	Grafikprogramm	Coral Corporation
Dataquest A.R.T.3.1	Telemetrie (Datenerfassung)	Data Science Inc.
GNU Image Manipulation Program	Bildnachbearbeitung	GIMP
Graph Pad Prism 9	Statistik, Grapherstellung	Graph Pad Software
ImageJ/Fiji	Histologie (Auswertung)	Wayne Rasband
Image Quant TL 7.0	Western Blot (quantitative Proteindetektion)	GE-Healthcare
Magellan 7.2	FRET-basierte $[K^+]_{ex}$ -Messung	Tecan

Software	Verwendung	Hersteller
Microsoft Office 2016	Datenbearbeitung	Microsoft
Vevo Lab	Echokardiographie (Analyse)	Visual Sonics
Vevo Strain 2100	Echokardiographie (Datenerhebung)	Visual Sonics
VisiView Software	FRET-basierte $[K^+]$ -Messung	Visitron
ZEN 3.2 (blue edition)	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	Carl Zeiss

### 2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial		Bestellnummer	Hersteller
Aluminiumfolie Rotilabo		2596.1	Carl Roth
Costar Stripetten	5 ml	CLS4487	Corning
	10 ml	CLS4488	Corning
	25 ml	CLS4489	Corning
	50 ml	CLS4490	Corning
Einmalhandschuhe Nitrile Powder-Free		290418	Abena
Filterpapier Rotilabo		CL67.1	Carl Roth
Kanülen	25G	300400	BD Microlance
	27G	302200	BD Microlance
	30G	304000	BD Microlance
Küvetten		67.742	Sarstedt
Parafilm M		PM-9969	Carl Roth
Pasteurpipetten, gestopft		E327.1	Carl Roth
Pasteurpipetten, ungestopft		4522.1	Carl Roth
PCR-Reaktionsgefäß	0,5 ml	30.124.537	Eppendorf
Petrischalen		82.1473.001	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	10 µl	765288	Greiner BioOne
	20 µl	774288	Greiner BioOne
	200 µl	739288	Greiner BioOne
	1000 µl	740288	Greiner BioOne
Pipettenspitzen, ungestopft	10 µl	701.116	Sarstedt
	20-200 µl	70.762.010	Sarstedt
	1000 µl	70.760.012	Sarstedt
Präzisionstücher Kimtech Science		AA64.1	Kimberly Clark
Reaktionsgefäß	1,5 ml	003012.0.086	Eppendorf
	1,5 ml	CH76.1	Carl Roth
	1,5 ml	72.706.400	Sarstedt
	2,0 ml	CK06.1	Carl Roth
	2,0 ml	72.695.500	Sarstedt
Spritzen 1ml Luer		3000013	BD Bioscience
Spritzenfilter PVDF		P666.1	Carl Roth
Vakuumfiltrationseinheit (Filtropur BT25)		831822	Sarstedt
Waagschalen groß (89x89x25 mm)		1884.1	Carl Roth
Waagschalen klein (41x41x8 mm)		1878.2	Carl Roth
Zählkammer C-Chip, Fuchs Rosenthal		2F13921	NanoEnTek
Zellkulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	430639	Corning
	75 cm <sup>2</sup>	430641	Corning
	175 cm <sup>2</sup>	4314669	Corning
Zellkulturplatten	6-Well	3516	Corning
	12-Well	3513	Corning

Verbrauchsmaterial		Bestellnummer	Hersteller
Zellkulturplatten	96-Well	655077	Greiner BioOne
Zellkulturschalen	8 cm <sup>2</sup>	430165	Corning
Zentrifugenröhrchen	15 ml	430766	Corning
	50 ml, konisch	430290	Corning
	50 ml, freistehend	430291	Corning
Zellsieb	100 µm	431752	Corning

## 2.2 Tiermodelle

### 2.2.1 Tierhaltung

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere wurde in der S1-Tierhaltung der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt. Gemäß rechtlichen Bestimmungen und Vorschriften festgelegt durch das Tierschutzgesetzes (TSchG) erfolgte die Versuchstierhaltung in einem offenen spezifisch Pathogen-freien (SPF) Haltungssystem bei einer Raumtemperatur (RT) von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$  sowie einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus. Gehalten wurden die Tiere in einer Gruppengröße von 2-3 Mäusen pro Erhaltungskäfig (Makrolon Typ II). Die Zucht der Versuchstiere fand in Zuchtkäfigen (Makrolon Typ III) durch Verpaarung eines männlichen mit 1-2 weiblichen Elterntieren statt. Grobes Holzeinstreu und Nistmaterial dienten als Grundausstattung für den jeweiligen Haltungskäfig. Durch das Bereitstellen von Kunststoffhäusern bei Einzel-, Verpaarungs- oder weiblicher Gruppenhaltung wurde das soziale Verhalten der Mäuse im Sinne des *environmental enrichments* zusätzlich gefördert. Frisches Trinkwasser und ein Standard-Nagetierfutter stand den Haltungstieren *ad libitum* zur Verfügung und wurde täglich kontrolliert.

### 2.2.2 Transgene Mauslinien

#### 2.2.2.1 Globale Slack *Knockout*-Mauslinie

Das konstitutive, globale Slack *Knockout* Mausmodell (Slack KO, Slack<sup>-/-</sup>) mit C57BL/6N-Hintergrund weist eine homozygote Deletion des Porenexons 11 im murinen *Kcnt1*-Gen auf und entstand im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Anne Bausch am hiesigen Institut. Die Generierung der Slack KO-Maus erfolgte durch homologe Rekombination in Kombination mit einem Cre/loxP-basierten Rekombinationssystem in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Lu et al. 2015). Als Kontrolle in tierexperimentellen Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* fungierten Wildtyp-Wurfgeschwister (Slack WT, Slack<sup>+/+</sup>). Die Verfügbarkeit der Versuchstiere und der Erhalt des Mausmodells wurde durch die Verpaarung heterozygoter Slack<sup>+/-</sup> Tiere gesichert.

#### 2.2.2.2 Kardiomyozyten-spezifische Slack *Knockout*-Mauslinie

Das konditionale, Kardiomyozyten-spezifische Slack *Knockout*-Mausmodell (CM Slack KO;  $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$ , Slack<sup>fl/-</sup>) ermöglicht eine gezielte Funktionsanalyse des kardialen Slack-Kanals

aufgrund seiner selektiven Deletion ausschließlich im kardiomyozytären Zellsystem. Die Generierung der konditionalen Mausmutanten erfolgte durch Verpaarung homozygot gefloxter Slack-Mäuse (Slack<sup>fl/fl</sup>) mit transgenen Tieren, die heterozygot und konstitutiv eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines myozytären Promotors ( $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup>, Slack<sup>+/+</sup>) exprimieren (Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018). Aufgrund der Verwendung des schwere Myosinkette ( $\alpha$ -Isoform,  $\alpha$ MHC)-kodierenden Gens (*Myh6*) als Promotor sind die Veränderungen der resultierenden Versuchstiere ausschließlich auf die Kardiomyozyten beschränkt (Agah et al. 1997). Mithilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems entstehen bei dieser Verpaarung neben den CM Slack KO-Tieren auch die als Kontrolltier-fungierenden Wurfgeschwister (CM Slack CTR;  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup>, Slack<sup>fl/+</sup>).

### 2.2.2.3 Globale Slick *Knockout*-Mauslinie

Das konstitutive, globale Slick *Knockout* Mausmodell (Slick KO, Slick<sup>-/-</sup>) beruht auf der Deletion des Exons 22 im murinen *Kcnt2*-Gen. Zur Gewinnung dieses Mausmodells wurde die ursprünglich gefloxt, kommerziell erwerbbar Slick-Maus (Slick<sup>fl/+</sup>) mit C57Bl/6J-Hintergrund (Martinez-Espinosa et al. 2015), deren *loxP*-Erkennungssequenzen das entsprechende Exon 22 flankieren, mit einer Cre-Deleter-Maus (CMV-Cre<sup>Tg/+</sup>) verpaart. Die Expression der Cre-Rekombinase im frühen Embryonalstadium führte zur konstitutiven Deletion des loxP-flankierten Zielgens (Schwenk et al. 1995). Ein zweiter Verpaarungsschritt der generierten Mäuse (CMV-Cre<sup>Tg/+</sup>; Slick<sup>+/+</sup>) diente zur Auskreuzung des Cre-Transgens und somit der Entstehung rein heterozygoter Slick<sup>+/+</sup>-Mäuse. Diese wurden wiederum untereinander verpaart, um letztlich homozygote Slick KO- Mäuse und Wildtyp-Wurfgeschwister (Slick WT, Slick<sup>+/+</sup>) zu gewinnen.

## 2.3 Genotypisierung

### 2.3.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
DNA-Marker (2-Log DNA-Ladder)	32000-S	New England Biolabs
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	8043.2	Carl Roth
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
KAPA HotStart Maus-Genotypisierungskit	07-KK7352-02	PeqLab
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	5429.3	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

### 2.3.2 Primer zur Genotypisierung

Mauslinie	Primertyp	Primersequenz von 5' - 3'
$\alpha$ MHC-Cre	F1	ATG ACA GAC AGA TCC CTC CTA TCT CC
$\alpha$ MHC-Cre	F2	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
$\alpha$ MHC-Cre	R1	CTC ATC ACT CGT TGC ATC ATC GAC
$\alpha$ MHC-Cre	R2	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
Slack	F1	AGG GGC TGA GAG GGG TCT CG
Slack	R1	TGG GTA GGG CTG CCA CAA GC
Slack	R2	GCC ACA ATC TGT TCC TTG GCA C
Slick	F1	AAC TTT ATG AGT TCC TCT TCC ATG
Slick	R1	GAG CAT CAT ACT TTG CTT TTT GGG

Die Primer-Lyophilisate werden mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) entsprechend den Herstellerangaben in einer Konzentration von 100  $\mu$ M gelöst. Die Primerstocklösung wird 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und auf eine Arbeitskonzentration von 20  $\mu$ M eingestellt.

### 2.3.3 Puffer und Lösungen

#### EDTA 0,5 M, pH 8,0

EDTA	186,1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

#### Xylencyanol-Lösung

Xylencyanol	10 mg
dH <sub>2</sub> O	2 ml

im Ultraschallbad lösen für ca. 15 min

#### Bromphenolblau-Lösung

Bromphenolblau	110 mg
dH <sub>2</sub> O	2 ml

#### 2 % Agarosegel

Agarose	2 g
1x TBE-Puffer	100 ml

#### 10x TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA 0,5 M; pH 8,0	40 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### 6x Ladepuffer

Ficoll 400	9 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	12 ml
10x TBE-Puffer	30 ml
Bromphenolblau-Lösung	1,3 ml
Xylencyanol-Lösung	1,5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

#### 1x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	100 ml
dH <sub>2</sub> O	9000 ml

Ficoll 400, EDTA und 10x TBE-Puffer für 1 h bei 60°C rühren, mit dH<sub>2</sub>O auf 47,3 ml auffüllen. Zugabe der Farbstofflösungen.

### 2.3.4 Ohrmarkierung und Probengewinnung zur Genotypisierung

Zur Ermittlung des jeweiligen Genotyps wird den Mäusen im Alter von 3 - 4 Wochen, i.d.R. vor dem Absetzen von den Elterntieren, Probenmaterial in Form einer Stanzung des Ohres entnommen. Diese Ohrmarkierung mittels Ohrlochstanze dient außerdem der Vergabe einer Stanzenummer, anhand derer die Maus dem ermittelten Genotyp jederzeit zugeordnet werden

kann. Diese minimalinvasive und wenig belastende Manipulation ersetzt das Anbringen von Ohrclips oder die Entnahme einer Schwanzbiopsie. Das gewonnene Ohrmaterial wird in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20 C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### 2.3.5 DNA-Isolierung

Für die Isolierung der Maus-DNA kommt das KAPA *HotStart* Maus-Genotypisierungskit (siehe 2.3.1) zum Einsatz, bestehend aus einem Extraktionsenzym (1 U/ $\mu$ l), einem Extraktionspuffer und einem Polymerasekettenreaktion (PCR)-Mix mit den Komponenten DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, Ladepuffer, Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Magnesiumchlorid. Die Verwendung dieses Kits ermöglicht eine schnelle Extraktion und Amplifikation von DNA aus dem murinen Ohrgewebe (siehe 2.3.4).

Die DNA-Isolierung beginnt mit der Herstellung eines Mastermixes für die Anzahl der Genotypisierungsproben und setzt sich zusammen aus 1,5  $\mu$ l Extraktionsenzym, 7,5  $\mu$ l Extraktionspuffer und 66  $\mu$ l RNase-freiem dH<sub>2</sub>O. Das murine Gewebe wird in 75  $\mu$ l Mastermix für 10 min bei 75°C und 400 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Durch die Aktivität der Protease kommt es zur Proteindegradierung und Freisetzung der DNA. Durch die ebenfalls stattfindende Proteolyse endogener DNAsen wird der DNA-Verdau inhibiert und die Extraktion einer maximalen Menge intakter DNA ermöglicht. Die anschließende Inkubation bei 95°C für 5 min und 400 rpm führt zur Inaktivierung der Enzyme. Durch die Zentrifugation bei 13.000 x g kann ein proteinreiches Pellet zusammen mit den Zellfragmenten und Organellen von dem Überstand mit der isolierten DNA getrennt werden. Diese wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.3.6 Polymerasekettenreaktion und DNA-Amplifikation

Zur Durchführung des Polymerasekettenreaktion (PCR)-Verfahrens benötigt es neben des zu amplifizierenden DNA-Strangs die dNTPs als Bausteine, Magnesium-Ionen, spezifische Primersequenzen zur Detektion des Zielabschnitts und die enzymatische Aktivität einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Mithilfe eines Thermocyclers wird die Replikation der DNA in Form eines Temperaturprotokolls imitiert und gliedert sich in mehrere Phasen (siehe Tabelle 2.1). Die Denaturierungsphase (T<sub>2</sub>) bei 95°C dient der Auftrennung der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen und somit der Spaltung der doppelsträngigen zu vervielfältigenden DNA. Bei einer *Annealing*-Temperatur (T<sub>3</sub>) von 59,7°C findet nachfolgend die Primerbindung an die nun einzelsträngig-vorliegenden DNA-Abschnitten statt. Während der Primerhybridisierung lagert sich der Vorwärtsprimer (F, *forward primer*) an das 3'-Ende des DNA-Strangs und der Rückwärtsprimer (R, *reverse primer*) an das 3'-Ende des komplementären DNA-Strangs an. In der anschließenden Elongationsphase (T<sub>4</sub>) bei 72°C werden die DNA-Stränge nun zeitgleich komplementär ergänzt und identische Doppelstränge gebildet. Dies gelingt durch die Aktivität der DNA-Polymerase unter Verwendung der dNTPs. Die Prozesse (T<sub>2</sub> - T<sub>4</sub>) der Denaturierung, des Annealings und der Elongation werden i. d. R. mindestens 30-fach wiederholt. Somit findet eine exponentielle Amplifikation des ursprünglichen DNA-Abschnitts statt, basierend darauf, dass jeder neu synthetisierte Strang im Folgezyklus als Matrize dient.

Für die Durchführung der PCR und zur Vervielfältigung der isolierten DNA-Proben (siehe 2.3.5) wird ein allgemein gültiger, Zielgen-unabhängiger Genotypisierungsansatz (siehe Tabelle 2.2) in 500 µl PCR-Gefäße pipettiert. Dieser setzt sich zusammen aus 12,5 µl PCR-Mix (KAPA *HotStart* Maus-Genotypisierungskit), jeweils 1 µl des zugehörigen Primers nach erfolgter 1:5 Verdünnung (siehe 2.3.2) und 1 µl Proben-DNA. Für ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Probe wird das noch nötige Volumen mit dH<sub>2</sub>O ergänzt. Das PCR-Temperaturprogramm ist in Tabelle 2.1 gezeigt. Da es sich bei dem verwendeten Enzym um eine *Hot Start* Polymerase handelt, wird diese während der Programmphase T1 zu Beginn der PCR bei einer Temperatur > 92°C aktiviert.

Tabelle 2.1 Temperaturprotokoll der Genotypisierungs-PCR

<b>PCR-Temperaturprogramm</b>		
T1	95,0°C	3 min
T2	95,0°C	15 s
T3	59,7°C	15 s
T4	72,0°C	15 s
Wiederholung T2 - T4:		30x
T6	72,0°C	5 min

Tabelle 2.2 Pipettierschema zur DNA-Amplifikation

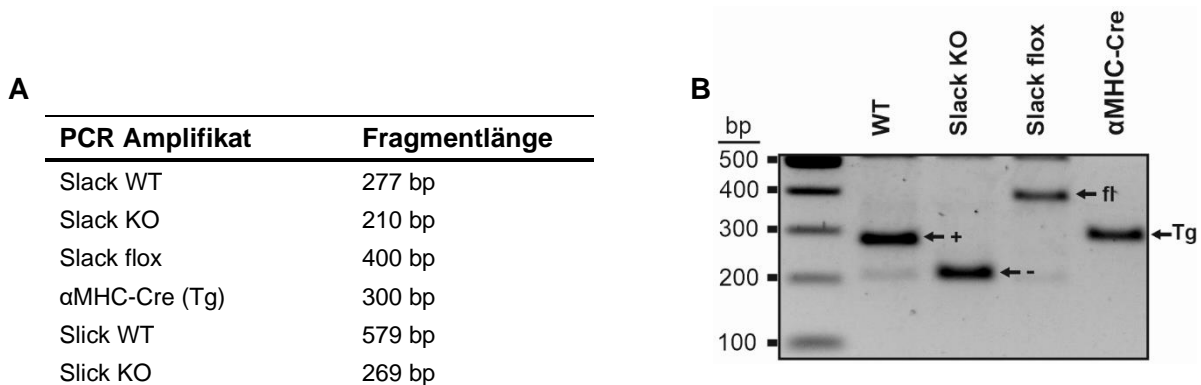
<b>Genotypisierungsansatz</b>	
KAPA PCR Mix	12,5 µl
Primer F/R	je 1 µl
DNA	1 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

### 2.3.7 Detektion der DNA-Fragmente

Die Detektion der DNA-Fragmente nach vorangegangener Amplifikation mittels PCR erfolgt nun mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Dieser Prozess dient der Auftrennung der DNA-Amplifikate im elektrischen Feld in Abhängigkeit der DNA-Molekülgröße. Durch die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren gegebene negative Ladung wandern die DNA-Bausteine mit umgekehrt proportionaler Geschwindigkeit zur Anode. Der polyanionische Charakter der DNA wird durch den eingesetzten 1x TBE-Puffer mit einem pH von 8,0 (siehe 2.3.3) gewährleistet. Zur Größenbestimmung der PCR-Amplifikate kommt ein Längenstandard (2-log DNA Ladder) zum Einsatz, der DNA-Fragmente mit definierter Länge (Basenpaar (bp)-Anzahl) enthält.

Das 2 % Agarosegel (siehe 2.3.3) wird durch das Erhitzen in der Mikrowelle hergestellt. Anschließend wird die homogene Masse unter ständigem Rühren bis zum Erreichen von Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Es folgt die Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und zur späteren Visualisierung der Fragmente unter UV-Belichtung dient. Das noch fließfähige Agarosegel wird in eine Gelgießkammer gegossen und Kämme für die Taschenformung gesteckt. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert ist, werden die Kämme gezogen und die entstandenen Taschen mit den Proben bzw. dem Längenstandard beladen. Die Genotypisierungsproben wurden zuvor mit dem 6x Ladepuffer (siehe 2.3.3) im Verhältnis 6:1 für die Auftragung vorbereitet. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt durch das Anlegen einer Grundspannung von 80 V für 15 min. Nachdem die Proben aus den Geldaschen gewandert sind, wird die Spannung auf 120 V erhöht und die elektrophoretische Auftrennung für ca. 1 - 2 h aufrechterhalten. Die Laufdistanz der Proben ist durch die im Ladepuffer vorhandenen Farbstoffe Bromphenolblau

(ca. 100 bp) und Xylencyanol (ca. 800 bp) nachverfolgbar. Zur Detektion der DNA-Fragmente kommt ein UV-Geldetektionssystem zum Einsatz. Mithilfe des DNA-Markers kann die Lauflänge des PCR-Produkts einer bp-Größe zugeordnet und letztlich der Genotyp ermittelt werden (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1 Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR mit anschließender Gelelektrophorese**

**(A)** Fragmentlänge in bp der verschiedenen PCR-Amplifikate. **(B)** Repräsentative Darstellung eines Agarosegels nach erfolgter Gelelektrophorese und Auftrennung der PCR-Ergebnisse von Slack WT- und Slack KO-Versuchstieren sowie geflochten (Slack flox) und  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase-exprimierenden Elterntieren.

## 2.4 *In vivo* Modelle

Alle Tierversuche am lebenden Tier erfolgten durch Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierungspräsidium Tübingen) unter Einhaltung des TSchG und der Tierschutzversuchsverordnung (TSchVersV) sowie unter regelmäßiger Kontrolle eines Tierschutzbeauftragten der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Tierversuchsanträge: PZ05/20G, PZ03/21G, Mitteilung nach §4: PZ08/18M sowie weitere).

### 2.4.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	KK13.1	Carl Roth
Anexate 0,5 mg/ 5 ml (Flumazenil)	PZN 03488574	Cheplapharm
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	PZN 1578681	Bayer
Buprenovet 0,3 mg/ml, 5x1 ml	PZN 1498870	Bayer
Cinaciguat	HY-14181	MedChemExpress
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Sigma-Aldrich
Dormilan 1mg/ml (Medetomidin)		alfavet
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Ethanol, absolut	32205	Sigma-Aldrich
Evans Blue (C.I. 23860)	A4388	AppliChem
Fentanyl HEXAL 0,1 mg/Ampulle	PZN 07524746	Hexal
Formaldehydlösung (35 %)	4979.1	Carl Roth
Glutaraldehyd (25 %)	3778.1	Carl Roth
Glucose 5 % Injektionslösung	PZN 04164425	B.Braun

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Intubationskanüle	73-2839	Harvard Apparatus
Isofluran CP	798-932	CP-pharma
Kunststoffröhrchen	Gel 20P	Art
Leukosilk-Gewebeklebeband	PZN 0397109	BSN Medical GmbH
Midazolam-ratiopharm 5mg/ml	PZN 04921754	ratiopharm
NaCl, isoton 0,9 %	PZN 02159621	Fresenius Kabi
Narcoren, 16 g/100 ml (Pentobarbital-Na <sup>+</sup> )	PZN 11336163	Boehringer Ingelheim
NahtmaterialEthibond Polyamid 6-0	1698H	Ethicon
Perma Hand Seide 5-0	K880H	Ethicon
Perma Hand Seide 7-0	K803H	Ethicon
Prolene Polypropylen 7-0	EH7812E	Ethicon
Nosedorm 5mg/ml (Atipamezol)		alfavet
Novaminsulfon 500 mg/ml (Metamizol)	PZN 07387887	1A Pharma
Objektträger Menzel Gläser	J2800AMNZ	Thermo Scientific
Octenisept Wunddesinfektion	PZN 04804008	Schülke & Mayr
OP-Instrumentbehälter	20830-02	FST
Pehazell	PZN 03545941	Paul Hartmann AG
Polyethylenschlauch	800/100/140	Smiths Medical
Q-tips Pflegestäbchen		W.Pelz GmbH
Veet Men Haarentfernungs-Creme	PZN 4916836	Reckitt Benckiser
Rasierklingen Classic		Wilkinson Sword
Resorba-Seide 7/0	R101	Resorba
Tergazyme	Z273287	Sigma-Aldrich
Ultraschallkontaktgel	4011	Sonogel

### Chirurgische Instrumente

<b>OP-Besteck</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Bulldogklemme	18050-35	FST
Elektrokoagulator (Low Cost Cautery Kit)	18010-00	FST
Gefäßklemme (Micro Serrefine)	18052-01	FST
Katheterhalter (Vessel Cannulation Forceps)	00608-11	FST
Nadelhalter (Castroviejo Micro Needle Holder)	12060-01	FST
Nadelhalter (Castroviejo Needle Holder)	12565-14	FST
Nadelhalter mit Schere (OlsenHegar)	12002-12	FST
Pinzette (Dumont #5 Forceps)	11251-20	FST
Pinzette (Graefe Forceps, Tips Curved)	11152-10	FST
Pinzette (Graefe Forceps, Tips Slight Curve)	11151-10	FST
Pinzette (Vessel dilating forceps angled 45°)	00276-13	FST
Schere (Standard Pattern Scissors)	14001-12	FST
Schere (Vannas-Tübingen Spring Scissors)	15003-08	FST
Schere extrafein (Extra Fine Bone Scissors)	14084-08	FST

## 2.4.2 Puffer und Lösungen

### 1 % TTC-Lösung

TTC	30 mg
PBS	3 ml

### 1 % Tergazym-Lösung

Tergazym	300 mg
dH <sub>2</sub> O	40 ml

### 3-Komponenten (3K)-Narkose

Medetomidin (500 µg/kg)	25 µl
Midazolam (5 mg/kg)	125 µl
Fentanyl (50 µg/kg)	25 µl
0,9 % NaCl-Lösung	325 µl

Stets frische Herstellung kurz vor Applikation.  
Gewichtsadjustierte i.p. Injektion in einer  
Mischspritze (25G): 10 ml/kg KG

### 1 % Evans Blue-Lösung

Evans Blue	400 ng
0,9 % NaCl-Lösung	ad 40 ml

### 2 % Glutaraldehyd-Lösung

Glutaraldehyd (25 %)	2 ml
dH <sub>2</sub> O	23 ml

### 3K-Antagonisierung

Flumazenil (0,5 mg/kg)	225 µl
Atipamezol (2,5 mg/kg)	25 µl
0,9 % NaCl-Lösung	200 µl

Gewichtsadjustierte s.c. Injektion in einer  
Mischspritze (25G): 10 ml/kg KG

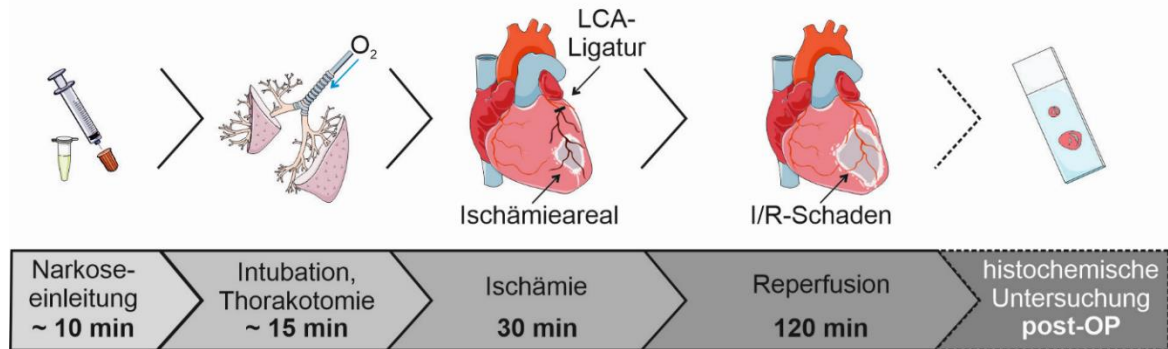
## 2.4.3 Pharmakologische Substanzen

Pharmakologische Substanz	Dosierung	Applikation	Anwendung	OP- Modell
Atipamezol	2,5 mg/kg	s.c.	Antagonisierung der 3K-Narkose	MI chronisch, Katheter-Implantation
Buprenorphin	0,05 - 0,1 mg/kg	s.c.	Analgesie	MI chronisch, Katheter-Implantation
Fentanyl	50 µg/kg	i.p.	3K-Narkose	MI chronisch, Katheter-Implantation
Flumazenil	0,5 mg/kg	s.c.	Antagonisierung der 3K-Narkose	MI chronisch, Katheter-Implantation
Isofluran	1,6 - 2,5 Vol. %	inhalativ	Narkose, APC	MI akut: APC, MI chronisch, Implantation der Telemetriesonden, Echokardiographie
Medetomidin	500 µg/kg	i.p.	3K-Narkose	MI chronisch, Katheter-Implantation
Metamizol	1,25 mg/ml Trinkwasser	p.o.	Analgesie	MI chronisch, Katheter-Implantation
Midazolam	5 mg/kg	i.p.	3K-Narkose	MI chronisch, Katheter-Implantation
Pentobarbital-Na <sup>+</sup>	70 mg/kg	i.p.	Narkose	MI akut

## 2.4.4 *In situ* Modell des akuten Myokardinfarkts

Das *in situ* Modell des akuten MI bietet die Möglichkeit, Schädigungen des Herzmuskels, ausgelöst durch I/R, in Form von nekrotischen Veränderungen v. a. durch den Untergang von Kardiomyozyten zu beobachten. Im Bereich der kardiovaskulären Grundlagenforschung haben sich aufgrund der Komplexität der pathophysiologischen Prozesse und der Beteiligung unterschiedlicher Kompartimente des Organismus eine Vielzahl verschiedener *in vivo* Modelle

etabliert (Fliegner et al. 2016). Das für diese Arbeit verwendete Modell beruht auf den Grundlagen von Guo et al. 1998 und wurde nachfolgend erfolgreich eingesetzt und publiziert (Eckle et al. 2006; Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018; Methner et al. 2013; Schwanke et al. 2002). In Abb. 2.2 ist der zeitliche Ablauf des *in vivo* Modells schematisch dargestellt. Unabhängig des verwendeten Konditionierungsregimes (siehe 2.4.4.5 - 2.4.4.7) beruhte die Myokardschädigung auf einer Okklusion der LCA für 30 min, gefolgt von einer Reperfusionsdauer von 120 min, aus der die Maus nicht wiedererwachte.



**Abb. 2.2 Zeitlicher Verlauf des akuten MI-Modells**

Die schematische Darstellung zeigt die Dauer der einzelnen Arbeitsschritte an der lebenden Maus (in schwarzer Schrift) und deutet die histologische Untersuchung (in weißer Schrift) des I/R-geschädigten Herzens an, die post-operativ nach der Euthanasie des Tieres stattfindet (Abb. 2.3). Die verwendeten Vorlagen zur Erstellung dieses Schemas wurden von *Smart Medical Art* ([smart.sevier.com](http://smart.sevier.com)) zur freien Verfügung gestellt.

#### 2.4.4.1 Anästhesie

Versuchstiere, die das akute MI-Modell durchlaufen, werden mit Pentobarbital-Natrium (70 mg/kg KG) narkotisiert (Eckle et al. 2006). Das Fertigarzneimittel Narcoren (siehe 2.4.1) mit einer Ausgangskonzentration von 16 g/100 ml wird in einem 2 ml Reaktionsgefäß in einem Verhältnis 1:8 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Die Injektionslösung (20 mg/ml) wird mithilfe einer 1 ml-Spritze aufgezogen und gewichtsadjustiert (5 ml/kg KG) mit einer 25G-Kanüle i.p. appliziert. Nach erfolgter Injektion wird die fixierte Maus zurück in den Heimatkäfig entlassen, sodass die Narkosewirkung in gewohntem Umfeld innerhalb von 10 min eintreten kann. Sobald die Maus das Bewusstsein verloren hat, wird sie auf die vorgewärmte Heizplatte (37°C) transferiert und in Rückenlage abgelegt. Dieser Transfer sollte grundsätzlich nach 10 min erfolgen, da das narkotisierte Tier nur unzureichend die Körpertemperatur halten kann. Die Narkosetiefe wird durch den Zwischenzehen- und Augenlidreflex kontrolliert, der gänzlich ausgeschaltet sein sollte. Ein leicht vorhandener Kornealreflex entspricht dem Stadium der chirurgischen Toleranz. Diese Kontrollen erfolgen in regelmäßigen Abständen, sodass bei ggf. Abflachen der Narkosetiefe in einer Dosierung von 10 mg/kg, d. h. 1/7 der Initialdosis nachdosiert werden kann (Eckle et al. 2006).

#### 2.4.4.2 Intubation und Thorakotomie

Die vollständig narkotisierte Maus wird in Rückenlage und waagrecht zur Ausrichtung zum Operateur positioniert und fixiert. Zur Regulation der Körpertemperatur wird eine Rektalsonde

eingeführt und ein Sollwert von  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  konstant gehalten. Für die Intubation des Versuchstiers wird die Trachea und der Larynx freigelegt. Dies erfolgt durch einen medianen Hautschnitt in der Halsregion und anschließendem Freilegen der Speicheldrüsen. Die Trachea-umspannende Muskulatur wird ohne Verletzung großer Blutgefäße durchtrennt bis ein ausreichend großes Blickfeld auf den Atemtrakt-Abschnitt gegeben ist. Für das Einführen der Intubationskanüle wird die Zunge aus der Mundhöhle gehalten und der Kopf durch ein Ziehen an den oberen Schneidezähnen überstreckt. Ist der endotracheale Sitz des Tubus visuell kontrolliert und sichergestellt, folgt die mechanische Ventilation der Maus mit einer Atemfrequenz von 140 Zügen/min und einem Inspirationsvolumen von ca. 150 - 175  $\mu\text{l}$  Sauerstoff ( $\text{O}_2, 100\%$ ). Letzteres wird über den Ventilator-verbundenen Schlauchdruck bei 10 cm Wassersäule gesichert (Inspirationsdruck 10 mbar, Expirationsdruck 3 mbar) (Schmidt et al. 2010). Das rhythmische Heben und Senken des Thorax und die rosige Färbung der Zunge bestätigen eine erfolgreiche Intubation.

Nach erfolgter Intubation als Grundvoraussetzung für die Durchführung einer Thorakotomie, wird ein zweiter Hautschnitt im linken Brustkorbbereich entlang des Sternums angesetzt. Die linke Rippenregion wird freigelegt und die beiden Brustmuskelstränge werden quer zum Verlauf der Sarkomere mithilfe eines Elektrokoagulators zur sofortigen Verödung der verletzten Blutgefäße durchtrennt. Zwischen dem dritten und vierten Rippenbogen wird auf identische Weise ein interkostaler Zugang zum Pleuraspalt geschaffen. Die vierte Rippe wird nun mit einer kleinen Schere durchtrennt und der Thorax einseitig weiter eröffnet. Anschließend werden die Rippenbögen 3 und 5 mit Polyethylen-Nahtfäden umstochen und entgegengesetzt gespannt. Das nun freiliegende Herz wird am Perikard erfasst und wenn notwendig gedreht, um den linken Ventrikel und die LCA klar zu identifizieren.

#### **2.4.4.3 Ligatur der linken Koronararterie und Reperfusion**

Nach erfolgter Thorakotomie und Identifikation der LCA wird diese mithilfe eines Polypropylen-Nahtfadens unter Führung eines Nadelhalters umstochen. Bei diesem Schritt ist das Gefäß durch den Nadeldruck im Ventrikel deutlicher zu erkennen, es darf allerdings zu keiner Unterbrechung des Blutflusses im Sinne einer Präkonditionierung kommen. Die Positionshöhe des Umstechens orientiert sich am Vorhof der Maus und ist i.d.R. nur um die Breite einer Pinzettenspitze darunter orientiert. Anatomisch präsentiert sich das Herzkranzgefäß entweder als dominant singuläre Arterie oder mit einer deutlichen Bifurkation unterhalb des linken Herzohrs (Klosinska et al. 2020; Michael et al. 1995). Bei einem gegabelten Erscheinungsbild der LCA sollte das Umstechen beide Zweige erfassen, um ein stabiles Risikoareal von ca. 60 % (bezogen auf den Gesamtventrikel) zu sichern.

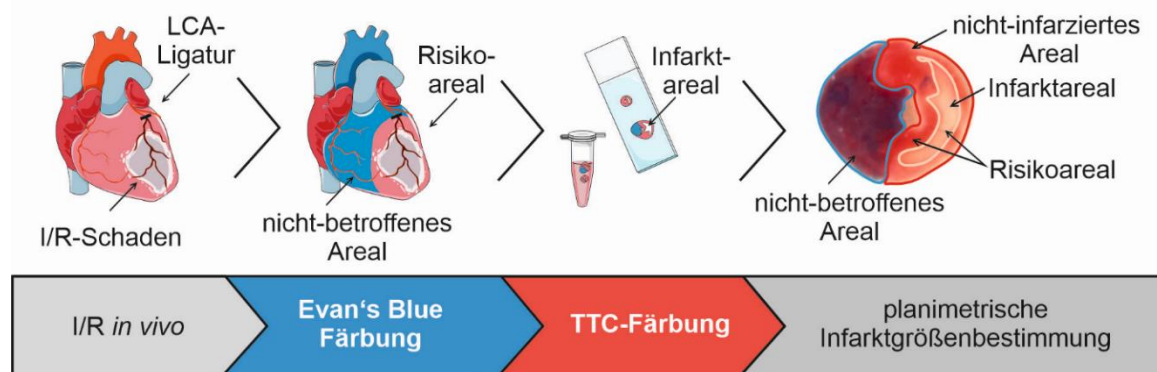
Anknüpfend an die kardiale Positionierung des Nahtmaterials wird ein Kunststoffröhrchen über beide Fadenenden gestülpt und auf die LCA gedrückt. Dadurch erfolgt eine vollständige Okklusion des Blutflusses, klar erkennbar an der weißlich-fahlen Verfärbung des distal liegenden Ventrikelareals. Um die Ischämie für 30 min aufrechtzuhalten, wird das Kunststoffröhrchen und die Fadenenden mit einem Nadelhalter fixiert. Für die Einleitung der Reperfusion für eine Gesamtdauer von 120 min wird das OP-Instrument aus seiner Sicherung und somit der äußere Druck auf das arterielle Gefäß gelöst. Der unmittelbar

wiedereinsetzende Blutfluss ist erkennbar an der Rückfärbung des Ventrikels und eine Garantie dafür, dass es zu keiner mechanischen Verletzung des Blutgefäßes während der Ischämie kam. Für die Reperfusionphase wird der eröffnete Thorax mit einem 0,9 % NaCl-Lösung-getränkten Zellstoff abgedeckt. Zusätzlich dient eine Aluminium-Schutzhülle dem Erhalt einer konstanten Körpertemperatur für die narkotisierte Maus.

#### 2.4.4.4 Färbung des Herzens und Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wird nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion eine Doppelfärbetechnik durchgeführt, die die Visualisierung des nicht-betroffenen Areal in blau und des Infarktareals in weiß ermöglicht (Bohl et al. 2009). Die Färbung findet nach zervikaler Dislokation der Maus statt. Alle Arbeitsschritte müssen sehr zügig und bei noch ausreichender Fließfähigkeit des Blutes erfolgen. Für die Durchführung des ersten Färbeschritts kommt eine 1 % Evans Blue Lösung (siehe 2.4.2) zum Einsatz, die retrograd des Blutflusses via *Aorta thoracica* in die Herzkranzgefäße injiziert wird. Zur Vorbereitung dieses Schrittes wird nach 120 min Reperfusion ein medianer abdominaler Hautschnitt getätigt. Die Darmschlingen werden aus dem Bauchraum geführt, um den infrarenalen Abschnitt der *Aorta abdominalis*, kaudal des Abgangs der Nierenarterien zu erreichen. Zur Erleichterung der Färbung wird mithilfe einer 1 ml Spritze und einer 30 G Kanüle ca. 600 - 800 µl Blut abgenommen. Im sofortigen Anschluss daran wird der Brustraum großzügig erweitert und mit den bereits vorliegenden Polyethylen-Nahtfäden aufgespannt. Die thorakale Aorta wird von den umliegenden Lungenflügeln und Fettdepots befreit, mit einem kleinen Querschnitt eröffnet und ein angeschrägter Polyethylenschlauch (Innendurchmesser: 0,4 mm, Außendurchmesser: 0,8 mm), verbunden mit einer 0,9 % NaCl-Lösung-gefüllten 1ml Spritze, eingeführt. Durch retrograde Injektion werden die Herzkranzgefäße gespült, erkennbar an der Entfärbung des Herzens. Der in der Reperfusionphase gelockerte Ligaturfaden wird erneut verschlossen und die Evans Blue Lösung auf identische Weise injiziert. Es resultiert eine vollständige Blaufärbung des rechten Ventrikels, während dessen der linke Ventrikel nur oberhalb der Ligatur und im Bereich der Hinterwand gefärbt wird. Das blau-gefärbte Gesamtareal repräsentiert die *area not at risk* (ANAR). Der darunter liegende und somit von der Okklusion betroffene Bereich (*area at risk*, AAR) verbleibt in seinem natürlichen Erscheinungsbild. Nach erfolgter Evans Blue Färbung wird das Herz aus dem Thorax entnommen, mit 0,9 % NaCl-Lösung auf einem fusselreien Tuch gereinigt und die Herzbasis von Gefäß- und Fettrückständen befreit. Die Atria bleiben zur korrekten Ausrichtung des Herzens erhalten. Nach der Erfassung des Herzgewichts wird dieses bei -20°C für maximal 20 min schockgefroren. In der Zwischenzeit wird die 1 % TTC-Lösung (siehe 2.4.2) hergestellt und in zwei 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Färbelösung wird auf einem Schüttler auf 37°C vorgewärmt. Die ca. 1 mm dicken Herzschnitte zur Bestimmung der Infarktgröße werden von Hand durch Verwendung einer Rasierklinge angefertigt. Im Anschluss werden sie für 30 min in der vorbereiteten TTC-Lösung bei 37°C und 350 U/min inkubiert. Vor allem in den ersten 5 min sollten die Reaktionsgefäße zusätzlich invertiert werden um ein Zusammenkleben der Herzscheiben zu vermeiden. Es liegen maximal 4-5 Scheiben in einem Behältnis vor. Bei diesem zweiten Färbeschritt handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte Redox-

Reaktion, bei der es zu einer Umwandlung der Ammoniumverbindung TTC zu dem roten Farbstoff Formazan kommt. Diese Reaktion kann ausschließlich in noch vitalen Zellen mit aktiven Dehydrogenasen stattfinden, d. h. das nekrotische Areal verbleibt ungefärbt (Rich et al. 2001). Zusätzlich werden die nun zweifach-gefärbten Herzscheiben für 24 h in einer 10 % Formaldehyd-Lösung lichtgeschützt bei RT inkubiert. Dafür werden sie zwischen zwei Objektträger mit identischer Ausrichtung der apikalen Seite positioniert und mit einem Parafilm fixiert. Zur Dokumentation werden die Herzscheiben zuletzt in einer dH<sub>2</sub>O-gefüllten Petrischale nach Größe geordnet und unter Verwendung eines Maßstabs für die Größenbestimmung fotografiert.



**Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Doppelfärbetechnik eines I/R-konditionierten Herzens zur planimetrischen Infarktgrößenbestimmung**

Zur quantitativen Erfassung des I/R-Schadens durch mechanische Ligatur der LCA wird eine Doppelfärbetechnik eingesetzt. Im ersten Schritt wird durch die retrograde Injektion von Evans Blue Lösung das nicht-betroffene Areal (ANAR) blau gefärbt. Das I/R-betroffene Risikoareal (AAR) wird in einem zweiten Färbeschritt durch die TTC-Färbung in das nekrotische Infarktareal (ungefärbt, weiß) und das nicht-infarzierte Areal (rot) aufgetrennt. Dieser Färbeschritt erfolgt nach der Anfertigung der Herzschnitte. Die anschließende planimetrische Auswertung dient zur Ermittlung des Risikoareals und des Infarktareals (in [%]). Die verwendeten Vorlagen zur Erstellung dieses Schemas wurden von *Smart Medical Art* ([smart.sevier.com](http://smart.sevier.com)) zur freien Verfügung gestellt.

Die planimetrische Infarktgrößenbestimmung erfolgte mittels der Software AxioVision Rel 4.8.1.0. Jede Herzscheibe wurde verblindet ausgemessen und die Pixelgröße des Gesamtareals, des nicht betroffenen Areals (blau) und des I/R-betroffenen Areals (weiß + rot) ermittelt. Innerhalb des I/R-betroffenen Risikoareals wurde zusätzlich zwischen nekrotischem (ungefärbt, weiß) und noch intaktem Areal (gefärbt, rot) differenziert. Mithilfe des dokumentierten Maßstabs konnte die Pixelgröße konkret auf ein Flächenmaß (mm<sup>2</sup>) umgewandelt werden. Grundsätzlich werden für die Kalkulation nur die Herzscheiben vom Apex bis zur Ligaturebene berücksichtigt. Diese ist erkennbar daran, dass alle nachfolgenden Scheiben blau erscheinen. Für die anschließende Statistik werden zwei Parameter ermittelt, die sich aus der Summe der einzeln vermessenen Herzscheiben eines Herzens ergeben. Das Risikoareal dient als Kontrollparameter für jedes analysierte Herz, da sich hieraus die Reproduzierbarkeit der OP-Methode ableiten lässt. Eine identische Positionierung der LCA-Ligatur, d. h. ein gleichbleibender Schädigungsindex des Myokards, ist für den interindividuellen Vergleich der Infarktareale essentiell. Dieser Wert berechnet sich prozentual aus dem Verhältnis der nicht-blau gefärbten Fläche zur Gesamtfläche der erfassten

Herzscheiben (in [%], I/R-betroffene  $\text{Areal}_{\text{weiß} + \text{rot}}/\text{Gesamtareal}_{\text{weiß} + \text{rot} + \text{blau}}$ ). Der zweite relevante Parameter ist das Infarktareal, das bei einem bestätigten, mittleren Risikoareal von ca. 60 % ermittelt wird. Das Infarktareal repräsentiert das prozentuale Verhältnis des nekrotischen Areals innerhalb des Risikoareals (in [%],  $\text{Infarktareal}_{\text{weiß}}/\text{I/R-betroffenes Areal}_{\text{weiß} + \text{rot}}$ ).

#### 2.4.4.5 Volatile Konditionierung

Die volatile Präkonditionierung mit einem Inhalationsanästhetikum aus der chemischen Verbindungsklasse der Flurane stellt eine Konditionierungsstrategie des I/R-exponierten Myokards dar, dass zur Reduktion der Infarktgröße und zur Verbesserung des Funktionserhalts führt (Kwok & Aizawa 2004). Um den I/R-Schaden der Mäuse zu reduzieren, wird ein Protokoll nach Redel et al. 2009 verwendet, bei dem die Tiere für 30 min mit dem volatilen Narkotikum Isofluran präkonditioniert werden (Abb. 2.4).



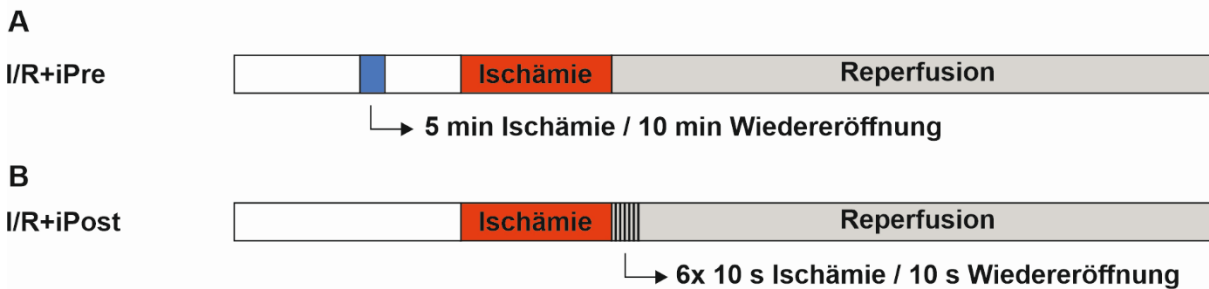
#### Abb. 2.4 Operationsschema für die volatile Präkonditionierung im akuten MI-Modell

Die volatile Präkonditionierung der Versuchstiere erfolgt durch Ventilation mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran für eine Gesamtdauer von 30 min und 1,3 Vol.-%. Nach einer 15-minütigen Auswaschphase (weiß) beginnt die chirurgische Durchführung des akuten MI-Modells, sodass 45 min nach Isofluran-Konditionierung die 30-minütige Ischämie und 120 min Reperfusion folgen. Die Evaluation des I/R-Schadens erfolgt analog Abb. 2.3.

Für diese Maßnahme werden die Tiere vor dem Beginn des *in situ* Modells des akuten MI (siehe 2.4.4) über eine murine Atemmaske mit einer minimalen alveolären Konzentration (*minimal alveolar concentration*) MAC 1,0 des Anästhetikums Isofluran ventiliert. Diese Maßeinheit entspricht einer alveolären Konzentration des Inhalationsanästhetikums, bei der ein Schmerzreiz zu 50 % ( $\text{MAC}_{50}$ ) inaktiviert wird. Je nach Wahl des Flurans variiert der prozentuale Anteil der zugeführten Atemluft (Vol.-%) in Abhängigkeit der Potenz deutlich. Um eine MAC von 1,0 bei C57Bl/6-Mäusen zu erzielen, wird eine Dosierung von 1,3 Vol.-% Isofluran empfohlen (Sonner et al. 2000). Nach einer 30-minütigen Präkonditionierung (Redel et al. 2009; Tsutsumi et al. 2006) wird das Isofluran ausgeleitet und die Tiere werden zurück in ihren Heimatkäfig transferiert. Es folgt eine Auswaschphase von 15 min. In dieser Zeit gewinnt die Maus ihr volles Bewusstsein und ihre Mobilität zurück. Diese Phase dient der vollständigen Erholung der Myokardfunktion und der Blutdruckregulation (Gargiulo et al. 2012; Van Allen et al. 2012), sodass für die anknüpfende LCA-Okklusion die endexpiratorische Abwesenheit des Flurans gesichert ist. In direktem Anschluss an die volatile Konditionierung wird das chirurgische Modell des akuten MI durchgeführt. Der ischämische Hauptstimulus erfolgt grundsätzlich nach einem definierten Zeitintervall von 45 min nach der Isofluran-Präkonditionierung.

### 2.4.4.6 Mechanische Konditionierung

Eine weitere Strategie, um das I/R-konditionierte Myokard vor kardialen Schaden und Funktionsverlust zu schützen, ist die mechanische Konditionierung. Es handelt sich hierbei um kurze Zeitintervalle, in denen es zu einer mechanischen Okklusion des Koronargefäßes kommt. Diese ischämischen Episoden können sowohl vor als auch nach dem ischämischen Hauptinsult stattfinden und werden dementsprechend als mechanische Prä- (iPre) bzw. mechanische Postkonditionierung (iPost) betitelt (Heusch 2015).



**Abb. 2.5 Operationsschemata für die mechanische Prä- und Postkonditionierung im akuten MI-Modell**

(A) Bei der mechanischen Präkonditionierung (iPre) wird die linke Koronararterie (LCA) der Versuchstiere für 5 min okkludiert, anschließend für 10 min wiedereröffnet, bevor die 30-minütige Hauptischämie anknüpft. (B) Die mechanische Postkonditionierung (iPost) findet nach der Indexischämie statt. Es erfolgen direkt zu Beginn der 120-minütigen Reperfusionsphase 6 Intervalle à 10 s LCA-Okklusion und 10 s Wiedereröffnung. Die Evaluation des I/R-Schadens erfolgt analog Abb. 2.3.

Wie in Abb. 2.5 dargestellt, wird der kardioprotektive Stimulus der ischämischen Präkonditionierung vor der eigentlichen Myokardschädigung durch I/R ausgelöst. Die LCA wird dafür für 5 min okkludiert. Im Anschluss knüpft eine 10-minütige Eröffnungsphase vor dem ischämischen Hauptinsult an. Für den konditionierenden Prozess wird die LCA an korrekter Stelle umstochen und das Kunststoffröhrchen zur Unterbrechung des Blutflusses fest auf das Gefäß positioniert. Nach 5-minütiger Okklusion wird der Nadelhalter aus seiner Sicherung gelöst und das Abklemmen der Koronarie für 10 min unterbrochen. Der weitere Prozess des akuten MI findet anschließend und wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben statt.

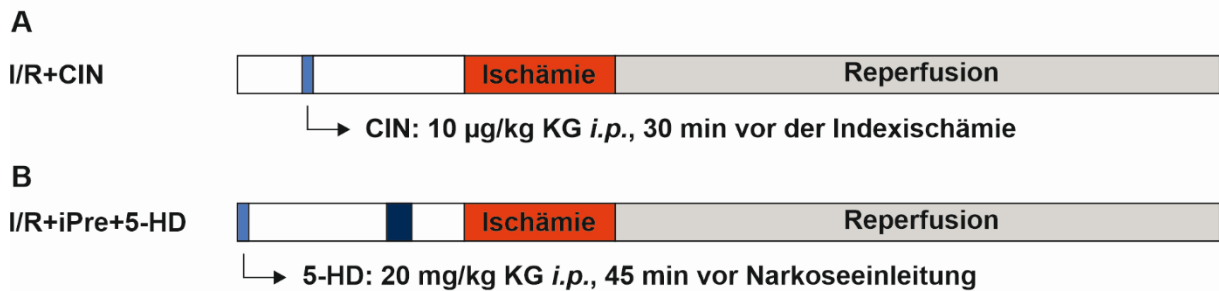
Bei der ischämischen Postkonditionierung (iPost) hingegen findet die mechanische Modulation des Koronarflusses nach der Indexischämie statt. Direkt nach dem ischämischen Insult wird die Okklusion der LCA für exakt 10 s gelöst und daraufhin erneut für 10 s okkludiert. Dieses Schema wird 6x wiederholt, bevor die Maus für die restlichen 120 min in der Reperfusionsphase verbleibt. Das Wechselspiel aus Okklusion und Wiedereröffnung wird wie gehabt mittels Kunststoffröhrchen und Nadelhalter durchgeführt. Die weiteren Schritte bis zur Auswertung des Infarktareals werden in der bereits beschriebenen Vorgehensweise umgesetzt.

### 2.4.4.7 Pharmakologische Modulation der Infarktgröße

Mithilfe pharmakologischer Substanzen gelingt es, spezifische kardioprotektive Signalwege im Zuge eines MI zu adressieren. Durch die gezielte Modulation verschiedener Effektoren (wie

z. B. Enzyme oder Ionenkanäle) können multiple Effekte, beispielweise ausgelöst durch volatile oder mechanische Konditionierung (Heusch 2015; Wojtovich et al. 2016), differenziert betrachtet werden. Außerdem bildet die pharmakologische Konditionierung eine Grundlage für zukünftige Therapieoptionen und verbesserte Behandlungsstrategien ischämischer Herzerkrankungen (Caricati-Neto et al. 2019).

Die Applikation der in Abb. 2.6 dargestellten und nachfolgend beschriebenen Substanzen Cinaciguat (CIN) und 5-Hydroxydecanoat (5-HD) basiert auf etablierten Protokollen und publizierten Daten (Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018).



**Abb. 2.6 Operationsschemata für die Applikation der pharmakologischen Substanzen Cinaciguat und 5-Hydroxydecanoat im akuten MI-Modell**

**(A)** Die Gabe des Guanylylzyklase-Aktivators Cinaciguat (CIN) erfolgt in einer Konzentration von 10 µg/kg KG via *i.p.* Injektion 30 min vor Beginn des ischämischen Insults. **(B)** Um der kardioprotektiven Funktion des ischämischen Präkonditionierens (iPre, in dunkelblau dargestellt) entgegenzuwirken, wird der mitoK<sub>ATP</sub>-Blocker 5-Hydroxy-Decanoate (5-HD) 45 min vor Narkoseeinleitung und dem Beginn des akuten MI-Modells gegeben. Dies erfolgt via *i.p.* Injektion in einer Dosierung von 20 mg/kg KG. Die Evaluation des I/R-Schadens erfolgt analog Abb. 2.3.

Die schwer lösliche Substanz CIN wird in einem ersten Schritt mittels DMSO auf eine Stockkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und in Aliquoten à 12 µl bei -20°C gelagert. Die weitere Verdünnung zur Herstellung der Injektionslösung (2,5 µg/ml) erfolgt in zwei Verdünnungsschritten (1:100 auf 10 µg/ml, daraufhin 1:4 auf 2,5 µl/ml) mittels 0,9 % NaCl-Lösung. Nach umgehender Lagerung bei 4°C wurde die verdünnte Injektionslösung innerhalb von 1 - 2 Wochen vollständig verbraucht. Das Applikationsvolumen (4 ml/kg KG) berechnet sich aus der Zieldosierung 10 µg/kg KG, d. h. eine 25 g schwere Maus wird mit einem Volumen von 100 µl CIN-Injektionslösung (2,5 µg/ml) konditioniert. Die Applikation erfolgt durch *i.p.* Bolusgabe (25G) 30 min vor Beginn der Ischämie (Abb. 2.6 A). Die pharmakologische Substanz wird also verabreicht, nachdem die Maus die chirurgische Toleranz nach Narkoseeinleitung erreicht hat. Die 30-minütige Latenzzeit dient den chirurgischen Eingriffen der Intubation, Thorakotomie und LCA-Identifikation. Die Gesamtdauer der ursprünglichen OP verlängert sich somit ausschließlich um 15 min.

Im Vergleich zu CIN ist die Festsubstanz 5-HD leicht löslich in 0,9 % NaCl-Lösung und wird direkt auf eine Zielkonzentration von 5 mg/ml gelöst und ebenfalls innerhalb von 2 Wochen nach Lagerung bei 4°C vollständig aufgebraucht. Für eine Zieldosierung von 20 mg/kg KG wird erneut mit einem Injektionsvolumen von 4 ml/kg KG gerechnet. Hier erfolgt die Bolusgabe durch *i.p.* Injektion (25G) 45 min vor der Narkoseeinleitung (Abb. 2.6 B) mit Pentobarbital-Natrium (siehe 2.4.4.1). Bis zur Narkoseeinleitung und anschließender LCA-Ligatur verbleibt das Versuchstier im Heimatkäfig.

## **2.4.5 Chronisches Modell des Myokardinfarkts**

Das chronische Modell des MI erlaubt es, Langzeitschäden in Form von hypertropher Modulation, Fibrosebildung oder Kontraktilitätsverlust des Herzens zu untersuchen. In diesem Modell wird die LCA erneut für 30 min okkludiert und die Reperfusionphase auf eine Gesamtdauer von 28 Tagen verlängert. Nach 4 Wochen erfolgt die Herzanalyse mittels Echokardiographie (siehe 2.4.6) und immunhistochemischer Färbung (siehe 2.12.4).

### **2.4.5.1 Anästhesie**

Im chronischen Modell des MI kommt ein vollständig antagonisierbares Narkoseregime (siehe 2.4.2) zum Einsatz, das eine sichere Narkosetiefe während des chirurgischen Eingriffs sowie eine effiziente Antagonisierung und Rückgewinnung der Vitalparameter ermöglicht. Namensgebend setzt sich die 3-Komponenten-Narkose (3K-Narkose) zusammen aus dem  $\alpha_2$ -Rezeptorantagonist Medetomidin (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG), dem kurzwirksamen Benzodiazepin Midazolam (5 mg/kg KG) und dem starkwirksamen Opioid Fentanyl (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Entsprechend den in Abschnitt 2.4.2 dargestellten Volumenverhältnissen werden die Substanzen gewichtsadjustiert (10 ml/kg KG) mit einer Mischspritze (25G) i.p. injiziert. Bis zum Eintreten der Bewusstlosigkeit wird das Tier zurück in seinen Heimatkäfig gesetzt. Innerhalb von 10 min erfolgt die Überführung auf eine 37°C vorgewärmte Heizplatte, auf der die Maus in Rückenlage und quer zum Operateur liegend, positioniert wird. Die Körpertemperatur wird mittels Rektalsonde kontrolliert und bei 37°C  $\pm$  0,5°C konstant gehalten. Die chirurgische Toleranz wird grundsätzlich und in regelmäßigen Abständen mithilfe des Zwischenzehen-, des Lid- und des Kornealreflexes kontrolliert. Um die Narkosetiefe über den gesamten Zeitraum des operativen Eingriffs aufrecht zu halten, wird 30 min nach Gabe der Injektionsnarkotika das volatile Anästhetikum Isofluran (1,0 - 2,0 Vol.-%) über eine Atemmaske bzw. die Intubationskanüle zugeschaltet.

### **2.4.5.2 Intubation und Thorakotomie**

Vor jedem operativen Eingriff wurde die OP-Fläche und die chirurgischen Instrumente sowie Nahtmaterialien mit 80 Vol.-% Ethanol desinfiziert. Um eine Intubation und Thorakotomie durchzuführen, wird die Maus in den betroffenen Körperregionen, in der Halsregion und dem linken Brustkorbbereich mit Enthaarungscreme enthaart.

Für die Intubation erfolgt ein ca. 1 cm langer medianer Hautschnitt am Hals. Mit stumpfen Pinzetten werden die Speicheldrüsen verlegt und die Trachea-umschließende Muskulatur nahe dem Larynx in möglichst kleinem Umfang durchtrennt. Die Intubationskanüle (Innendurchmesser: 0,8 mm, Außendurchmesser: 1,2 mm) wird unter visueller Kontrolle über den Mundraum in die Trachea eingeführt. Für diesen Schritt wird die Maus an den oberen Schneidezähnen mithilfe einer feinen Handseide überstreckt. Für die ersten 30 min nach Injektion der 3K-Narkose erfolgt die Ventilation der Maus mit reinem O<sub>2</sub> bei einer Flussrate von 0,8 l/min und einer Atemfrequenz von 140 Zügen/min. Anders als im akuten MI-Modell ist der Sauerstofffluss zusätzlich über einen Isofluran-Verdampfer geschaltet, sodass beim Nachlassen der Wirkstärke der Injektionsnarkose nach 30 min die Ventilation mit einem

Isofluran/O<sub>2</sub>-Gasgemisch fortgesetzt werden kann. Um einem übermäßigen Druck auf das murine Ventilationsgerät entgegenzuwirken, unterstützt ein eingebautes Y-Stück im Schlauchsystem das Umleiten übermäßiger Gasmengen über das vorhandene Ableitungssystem. Das Ventilationsvolumen des Versuchstiers liegt gewichtsadjustiert in einem Bereich von 145 - 175 µl. Nach erfolgter Intubation wird das mechanisch eröffnete Gewebe an seinen Ursprungsort zurückplatziert und der Hautschnitt durch Einzelknopfnähte unter Verwendung von chirurgischer Handseide (7-0) verschlossen.

Für die nun anknüpfende Thorakotomie wird ein weiterer Hautschnitt (ca. 2 cm Länge) von der linken Achselhöhle der Maus aufsteigend Richtung Sternum platziert. Die oberflächigen Faszien werden mit stumpfen Pinzetten durchtrennt und die Muskelschicht des linken Thorax freigelegt. Nachdem auch das Bindegewebe zwischen den einzelnen Muskelfasern gelöst ist, können diese mithilfe steriler Polypropylenfäden auf Höhe des dritten Rippenbogens umstochen und entgegengesetzt aufgespannt werden. Interkostal wird zwischen der dritten und vierten Rippe ein Zugang zur Pleurahöhle geschaffen. Um die Lunge und den arteriellen Ast der *Arteria subclavia* (*Arteria thoracica interna*) nicht zu verletzen, wird die Öffnung mit einer extrafeinen Schere nur geringfügig erweitert und die angrenzenden Rippenbögen mit Nahtfäden umstochen. Durch entgegengesetztes Aufspannen auch von diesen Fäden wird ein chirurgisch ausreichendes Blickfenster auf das schlagende Herz geschaffen.

#### **2.4.5.3 Ligatur der linken Koronararterie und Wundverschluss**

Durch die verwendete Narkose mit den Einzelkomponenten Fentanyl und Isofluran ist die Herzfrequenz (HF) im Vergleich zum akuten Modell des MI verlangsamt (Gargiulo et al. 2012; Tanaka et al. 2014; Xu et al. 2017). Die pharmakologisch-induzierte Bradykardie begünstigt zumindest technisch das Erkennen und Umstechen der LCA bei in diesem Modell notwendiger und deutlich kleinerer Thoraxeröffnung. Für diese Maßnahme wird das Herz durch Greifen des Perikards in die notwendige Position gedreht. Mithilfe eines Nadelhalters wird dann ein Polypropylenfaden, wie in Kapitel 2.4.4.2 beschrieben, um die LCA geführt und der Blutfluss durch mechanische Okklusion unterbrochen. Dafür wird erneut ein Kunststoffröhrchen auf das LCA-umschließende Nahtmaterial gefädelt und mit ausreichend Druck auf das Herz gepresst. Die Unterbrechung der distal liegenden Blutversorgung aufgrund der LCA-Okklusion ist erkennbar an der Entfärbung (weißlich-fahl) des Ventrikels. Die Ligatur wird für 30 min durch das Sichern mit einem Nadelhalter aufrechterhalten. In diesem Zeitraum wird die Thoraxöffnung mit einem 0,9 % NaCl-getränkten Tupfer abgedeckt. Um die gespreizten Muskelstränge vor dem Austrocknen zu schützen, werden diese mit Dexpanthenol-haltiger Fettcreme bedeckt.

Nach Beendigung des ischämischen Stimulus nach 30 min wird der Nadelhalter aus seiner Sicherung gelöst, das okkludierende Kunststoffröhrchen vom Herzen entfernt und der intrakardial-positionierte Nahtfaden verletzungsfrei herausgezogen. Eine sofortige Rückfärbung (rot) des Herzens ist zu beobachten. Die Rippen aufspannenden Polypropylenfäden werden ebenfalls gelockert und in einem zweiten Schritt um den jeweils gegenüberliegenden zweiten Rippenbogen geführt. Der Verschluss des Interkostalschnitts gelingt durch das Zusammennähen (Doppelknoten und Einzelknoten) der dritten und vierten

Rippe. Im Zuge der Verknotung wird der Brustkorb nach unten gepresst, um die vorhandene Luft aus dem Brustraum zu entfernen. Anschließend wird der luftdichte Verschluss überprüft, indem wenige Tropfen 0,9 % NaCl-Lösung auf die Nahtstellen gegeben werden und dabei nicht versacken bzw. keine Luftblasenbildung zu erkennen ist. Im nächsten Schritt werden die Muskulatur aufspannenden Fäden gelöst und die beiden Muskelstränge in ihre ursprüngliche Position zurückgebracht. Eventuell auftretende Verklebungen werden durch den Einsatz von 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Zuletzt wird der Hautschnitt durch ca. 8 - 10 Einzelknopfnähte verschlossen. Insbesondere im Bereich des Brustkorbs ist es von Bedeutung auf eine geflochtene Fadenstruktur in Form von Handseide zurückzugreifen. Anders als bei einer monofilen oder pseudomonofilen Filamentstruktur, gelingt es den Tieren i.d.R. nicht, die Nähte im Brustbereich zu öffnen und dadurch eine Wundheilungsstörung zu provozieren.

#### **2.4.5.4 Narkoseausleitung und analgetische Versorgung**

Nach Abschluss des chirurgischen Prozedere (siehe 2.4.4.2 f.) wird zunächst die Isofluran-Zufuhr, d. h. die inhalative Narkose beendet und die Ventilation mit reinem O<sub>2</sub> fortgeführt. Der bei der OP entstandene Flüssigkeitsverlust der Maus wird durch die i.p. Gabe von 400 - 600 µl vorgewärmter 0,9 % NaCl-Lösung kompensiert. Die Antagonisierung der 3K-Narkose erfolgt durch die s.c. Injektion (25G) von Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Atipamezol (2,5 mg/kg KG) in einer Mischspritze (siehe 2.4.2). Das Injektionsvolumen (10 mg/kg KG) wird durch zwei Injektionsansätze appliziert, um die Verteilung zu beschleunigen und die subkutane Taschenbildung zu begrenzen. Der Wiedereintritt des Bewusstseins findet in einem kurzen Zeitraum von 2 - 5 min statt. In dieser Zeit wird die Maus sorgfältig überwacht und die Extubation aktiv durchgeführt, nachdem ein deutliches Gegenatmen des Tiers zu beobachten ist. In einer fließenden Bewegung wird die Intubationskanüle entfernt und die Maus sofort in Bauchlage gebracht. Sobald sich die Atmung der Maus innerhalb weniger Sekunden stabilisiert hat, wird sie in ihren Heimatkäfig gesetzt, in dem sie ungestört ihr volles Bewusstsein zurückgewinnen kann. Um einer Unterkühlung entgegenzuwirken, wird eine Wärmelampe mit Temperatursensor (Soll: 30°C) vorbereitet. Die Versuchstiere verbleiben grundsätzlich für 1 - 2 h unter der Wärmelampe zur Förderung der Regeneration.

Die analgetische Versorgung setzt sich zusammen aus der Behandlung mit dem Opioid Buprenorphin und dem Antipyretikum Metamizol. Bereits 30 min nach dem Beginn des chronischen MI-Modells wird eine s.c. Injektion von 0,05 - 0,1mg/kg KG Buprenorphin durchgeführt. Das Injektionsvolumen berechnet sich aus einer Dosierung von 2 ml/kg KG nach erfolgter Verdünnung im Verhältnis 1:6 mit 0,9 % NaCl-Lösung. Die verdünnte Buprenorphin-Injektionslösung wird bei 4°C gelagert und innerhalb von 1 - 2 Tagen vollständig aufgebraucht. Die intraoperative Gabe des starkwirksamen Analgetikums sichert ein zeitlich ausreichendes Anfluten des Opioids und verhindert das Auftreten von Schmerzspitzen unmittelbar nach Narkoseausleitung. Für die ersten drei postoperativen Tage erhält die Maus im 8 h Zyklus jeweils eine s.c. Bolusgabe von 0,05 - 0,1mg/kg KG Buprenorphin. Ab dem vierten postoperativen Tag kann die analgetische Nachversorgung mit Metamizol fortgesetzt werden. Der große Vorteil dieser Substanz ist die perorale (p.o.) Verfügbarkeit. Das Tier hat 24 h lang Zugang zu dieser analgetischen Komponente in einer Dosierung von 1,25 mg/ml Trinkwasser

über das am Käfig angebrachte Trinkbehältnis. Das Metamizol-haltige Trinkwasser wird täglich erneuert. Aufgrund des oftmals bitteren Geschmacks des Handelspräparats wird ein Ansüßen der p.o. Analgesie empfohlen (Kumstel et al. 2020). Außerdem wird das Tier innerhalb der ersten Woche mehrmals täglich auf Schmerzzeichen anhand eines fundierten Punktevergabe-Protokolls kontrolliert und eine Gewichtsverlaufskurve dokumentiert. Insgesamt befindet sich das Tier für 28 Tage in der Reperfusion, in der auch in den Folgewochen 2 - 4 eine regelmäßige Kontrolle des Allgemeinzustands durchgeführt wird. Das chronische MI-Modell, bestehend aus 30 min Ischämie und 28 Tagen Reperfusion, endet durch die nachfolgend beschriebene Durchführung der Echokardiographie (siehe 2.4.6) und Euthanasie des Versuchstiers für histologische Untersuchungen des Herzens (siehe 2.12).

#### 2.4.6 Murine Echokardiographie

Die murine Echokardiographie ermöglicht die Untersuchung der Herzfunktion am lebenden, narkotisierten Tier, sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen Modell. Besonderes Augenmerk liegt bei dieser Arbeit auf der linksventrikulären systolischen Funktion. Ein grundlegender Parameter dafür ist die fraktionelle Verkürzung bzw. Verkürzungsfraction (FS, *fractional shortening*), das die prozentuale Änderung des Ventrikel-Durchmessers während der Systole darstellt und sich wie folgt berechnet:

$$FS(\%) = \frac{EDD - ESD}{EDD} \cdot 100$$

##### Formel 2.1 Berechnung der linksventrikulären Verkürzungsfraction

Die Verkürzungsfraction (FS, in %) ist ein prozentualer Wert, der sich aus den Durchmesser-Verhältnissen der Systole und der Diastole des linken Ventrikels berechnet. EDD: enddiastolischer Durchmesser, ESD: endsystolischer Durchmesser.

Der zweite, dominierende Parameter zur Beurteilung der systolischen Funktion ist die Auswurfraction (EF, *ejection fraction*), dessen Konzept 1962 von den Medizinern Folse und Braunwald eingeführt wurde (Folse & Braunwald 1962). Die Auswurfraction ist ein prozentuales Maß für die Auswurfleistung des Herzens während der Systole und berechnet sich, wie nachfolgend dargestellt, aus den Volumenverhältnissen der Systole und der Diastole:

$$EF(\%) = \frac{EDV - ESV}{EDV} \cdot 100$$

##### Formel 2.2 Berechnung der linksventrikulären Auswurfraction

Die Auswurfraction (in %) beschreibt die Herzleistung in Form der Auswurfkapazität an Blutvolumen während der Systole. Somit berechnet sich dieser Wert aus den Füllvolumina des linken Ventrikels während der Systole und der Diastole. EDV: enddiastolisches Volumen, ESV: endsystolisches Volumen.

Die nicht-invasiven Herzfunktionsanalyse wurde an einem murinen Echokardiograph (Vevo 2100) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meinrad Gawaz, Abteilung Innere Medizin III, Medizinische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Das zur Verfügung gestellte Ultraschallgerät ist mit einer 30 MHz Ultraschallsonde

ausgestattet. Die Datenerfassung und -analyse mithilfe der Software VevoLAB erfolgte durch dieselbe Person, die bereits das chronische Modell des MI (siehe 2.4.5) an allen Versuchstieren durchgeführt hat.

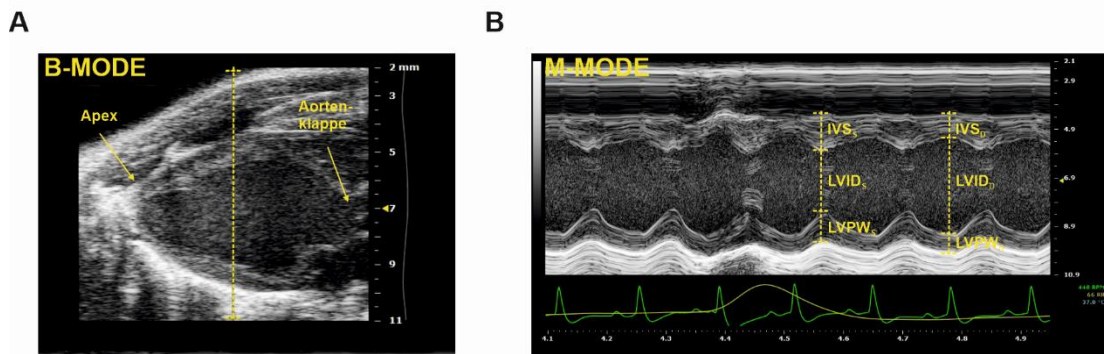
#### **2.4.6.1 Anästhesie und Ultraschalluntersuchung an der Maus**

Das Echokardiographiesystem für Kleintiere ist mit einem Isofluran-Vapor, einer Atemmaske und einer Absaugungsanlage für das Narkosegas ausgestattet. Bei einer O<sub>2</sub>-Zufuhr von 0,8 l/min und einem Isofluran-Volumenanteil von 1,5 - 2,0 Vol.-% wird die Sedierung der Versuchstiere über den gesamten Untersuchungszeitraum von maximal 30 min induziert und aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wird mithilfe des Zwischenzeh-, Lid- und Kornealreflexes regelmäßig kontrolliert. Die Körpertemperatur der Maus wird über eine Rektalsonde überwacht und bei  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  gehalten. Die dafür benötigte Heizplatte ist mit zusätzlichen Elektroden ausgestattet, um die Ableitung eines Elektrokardiogramms über die Pfoten zu ermöglichen. Eine geringe Menge Kontaktgel wird auf die Elektroden aufgetragen und die Pfoten werden mit medizinischem Klebeband fixiert. Die HF der Tiere darf während der Sequenzaufnahme grundsätzlich nicht  $< 400$  Schläge/min (bpm) liegen. Das Fell wird im linken Brustbereich großzügig von der linken Achselhöhle bis unterhalb des Sternums mit einer Enthaarungscreme entfernt. Eine gründliche Entfernung aller Cremerückstände und Verklebungen ist notwendig, um keine Schallgeräusche zu provozieren. Ebenso ist ein luftfreies Auftragen des auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten Ultraschallgels zu beachten. Die sonographische Untersuchung des murinen Herzens erfolgt in parasternaler Langachse (PSLAX, *parasternal long axis*) jeweils im zweidimensionalen B-Mode (*brightness mode*) und im M-Mode (*time mode*). Die Plattform mit der Maus wird dafür nach links gekippt und um ca.  $30^{\circ}$  um die anterior-posteriore Achse rotiert. Anschließend wird der Schallkopf in vertikale Richtung ausgerichtet und um ca.  $10^{\circ}$  entgegen des Uhrzeigersinns gedreht (Pistner et al. 2010). Nun wird die Sonde über der linken parasternalen Linie positioniert und ein Gel-Oberflächenkontakt geschaffen. Nachdem das Herz auf dem Bildschirm des Echokardiographiesystems sichtbar wird, folgen anpassende Maßnahmen der Ausrichtung, bis der aortale Ausflusstrakt und die Herzspitze horizontal in einer Ebene zu erkennen sind (Abb. 2.7 A). Ist die Messung abgeschlossen, wird die narkotisierte Maus aus der Fixierung gelöst, mittels zervikaler Dislokation getötet und das Herz für histologische Untersuchungen (siehe 2.12) entnommen.

#### **2.4.6.2 Auswertung mittels konventioneller M-Mode Methode**

Die konventionelle Methode zur Auswertung der echokardiographischen Aufnahmen basiert auf der Längenbestimmung der linksventrikulären Dimensionen während der Systole und Diastole. Für diese Auswertungsmethode werden M-Mode Aufnahmen verwendet, die eine ausgewählte Schallzeile (i.d.R. am Papillarmuskelansatz Richtung Apex) mit hoher Wiederholungszahl über die Zeit abbilden (Abb. 2.7). Pro untersuchtem Tier werden ca. drei M-Mode Aufnahmen in drei verschiedenen Tischpositionen ausgewertet. Zusätzlich werden innerhalb einer Aufnahme drei Werte pro Parameter in beiden Herzschlagphasen ausgemessen. Zusammenfassend ergeben sich daraus 9 technische Replikate, deren Mittelwert ( $n=1$ ) in die statistische Analyse eingeht. Bei den genannten Parametern handelt es

sich um die Länge des Interventrikulärseptums (IVS, *interventricular septum*) und der Hinterwanddicke (LVPW; *left ventricular posterior wall*). Ein dritter Parameter repräsentiert den Innendurchmesser des linken Ventrikels (LVID, *left ventricular inner diameter*). Neben der Gegenüberstellung der Wanddicken und Lumendimensionen, lassen sich daraus auch die globalen Parameter EF and FS, wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben, berechnen.



**Abb. 2.7 Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion mittels konventioneller M-Mode Auswertung**

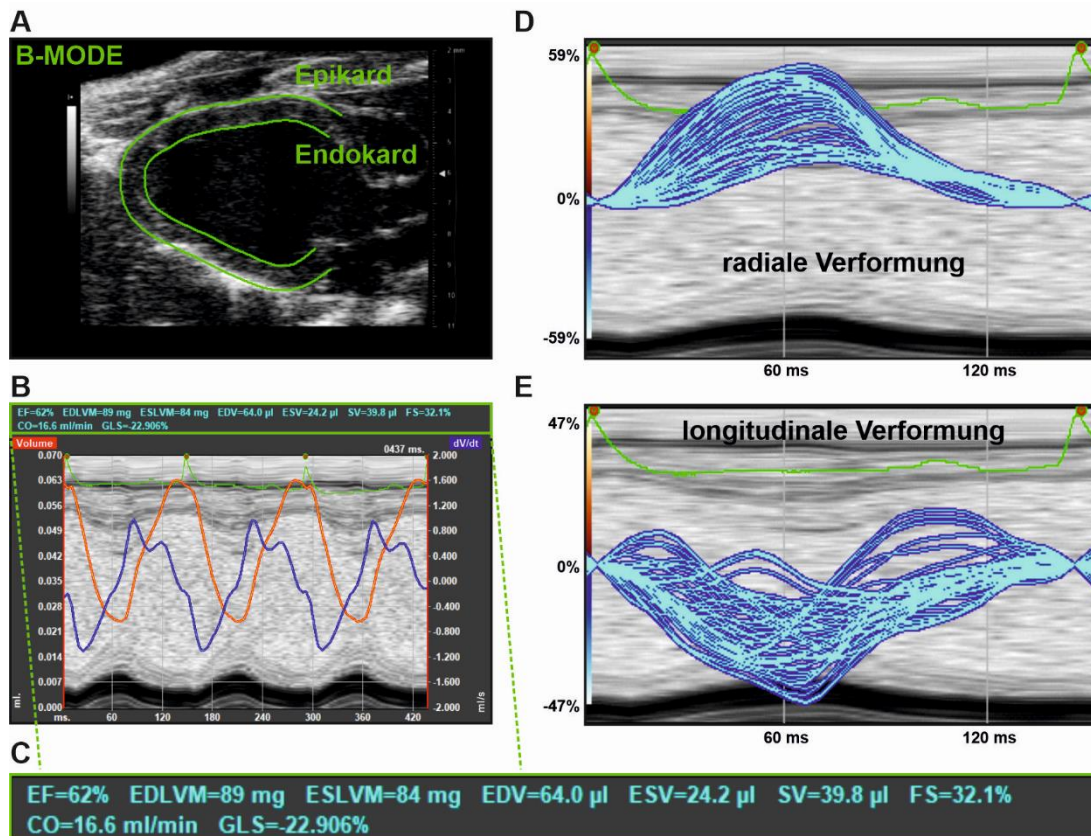
(A) Repräsentative B-Mode-Aufnahme mit Positionierung der Schallzeile (gelb) für den M-Mode-Wechsel. Das Herz befindet sich in horizontaler Linie mit klar erkennbarem Apex und der Aortenklappe. (B) Repräsentative M-Mode-Aufnahme mit 300 Einzelbildern (*frames*) bei einer HF > 400 bpm zur Darstellung der Ventrikelbewegung in beiden Herzschlagphasen. Manuelle Ausmessung der linksventrikulären Wanddicken und des Innendurchmessers (gelb) am maximalen Dehnungspunkt der Systole (Subskript S) und Diastole (Subskript D). IVS: Interventrikulärseptum, LVID: linksventrikulärer Innendurchmesser, LVPW: linksventrikuläre Hinterwanddicke.

### 2.4.6.3 Auswertung mittels der STE-basierten Methode

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion ist die *speckle-tracking echocardiography* (STE)-basierte Auswertmethode, die ebenfalls mithilfe der VevoLab-Analysensoftware des Herstellers FUJIFILM VisualSonics im zweidimensionalen B-Mode-Sonogramm erfolgt. Diese quantitative Ultraschalltechnik ermittelt die myokardiale Funktion anhand der Bewegung einzelner Punkte (*speckles*) innerhalb einer Herzschlagphase, die entlang des Endo- und Epikards positioniert sind (Mondillo et al. 2011). Es gelingt somit eine objektive Darstellung der globalen Parameter wie z. B. der EF und der FS, aber auch die Ermittlung der regionalen myokardialen Funktion, die insbesondere im pathophysiologischen Modell segmentbezogen verändert sein kann. Im Vergleich zur konventionellen M-Mode-Methode (siehe 2.4.6.2), deren Auswertung auf einer definierten Schallachse beruht, erfasst die STE-basierte Methode die Muskelkontraktivität via Deformation des gesamten Ventrikels. Dies erklärt, dass bereits erste pathophysiologische Veränderungen des Myokards, die aus kompensatorischen Aspekten noch kaum eine Auswirkung auf die globale Herzleistung haben, erkennbar werden (Yamada et al. 2013).

Die Grundvoraussetzung für eine valide Durchführung der STE-basierten Auswertmethode nach Bauer et al. 2011 ist eine hohe Bildqualität der Ultraschallaufnahmen aller Versuchstiere (siehe 2.4.6.1). Grundsätzlich wurden nur die B-Mode-Sequenzen ausgewertet, bei denen die Software selbstständig zwischen Systole und Diastole differenzieren konnte. Pro Aufnahme wurden drei aufeinanderfolgende Herzschlagzyklen ausgewertet und gemittelt.

In PSLAX-Ausrichtung erfolgt das *tracing* des Myokards, ausgehend von der apikalen Herzseite. In manueller Vorgehensweise werden 10 Punkte entlang des Endokards gesetzt, und die semiautomatische Programmierung der Software vervollständigt die Erfassung des Epikards, welche ggf. manuell angepasst werden kann. Für die nachfolgende Analyse und optimale Erfassung der Ventrikeldeformation wird die Anzahl der gesetzten Punkte entlang des Endo- und Epikards auf 48 extrapoliert (Abb. 2.8 A). Die globale Analyse der Herzfunktion (*LV wall trace*) präsentiert sich in einem ersten Arbeitsfenster (Abb. 2.8 B - E), in dem auch der wellenförmige Verformungsverlauf aller Messpunkte in radialer und longitudinaler Wandbewegung nachverfolgt werden kann.

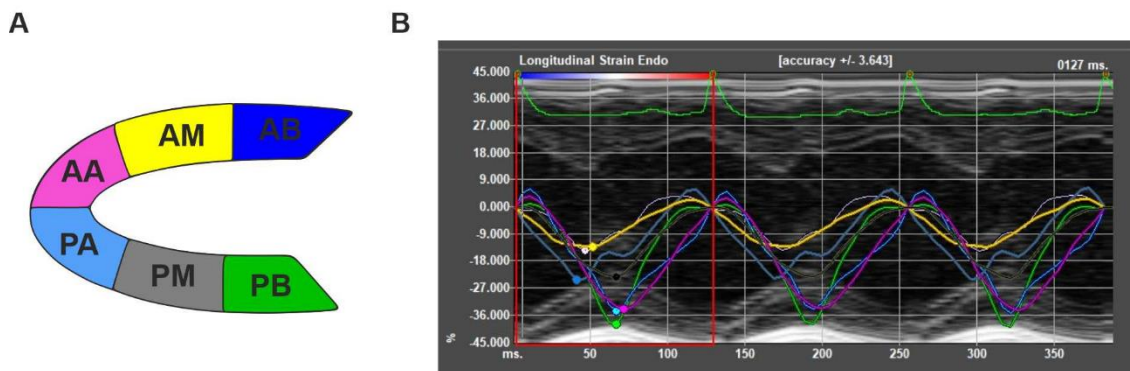


**Abb. 2.8 STE-basierte globale Funktionsanalyse des linken Ventrikels**

(A) B-Mode-Echokardiogramm des linken Ventrikels in PSLAX-Ausrichtung. Semiautomatische Erfassung des Endokards (Innenschicht) und Epikards (Außenschicht) (in grün dargestellt) in 48 Punkten. (B) Graphische Darstellung der Volumenverteilung im Verlauf der kardialen Herzschlagphasen. Die gemessenen funktionalen und strukturellen Parameter werden oberhalb des Graphen (in grün umrandet) wiedergegeben und als Vergrößerung in (C) visualisiert. Darstellung der radialen (D) bzw. longitudinalen Verformung (E) aller 48 Messpunkte innerhalb eines Herzzyklus. Die Enddiastole entspricht 0 % der Verformung. Die Kontraktion des Herzmuskels führt zu einer radialen Verdickung der Herzwand, d. h. die radiale Verformung wird positiv und zu einer longitudinalen Verkürzung der Myokardfasern, d. h. die longitudinale Verformung wird negativ. CO: Herzzeitvolumen (*cardiac output*), EDLVM: enddiastolische linksventrikuläre Masse, EDV: enddiastolisches Volumen, EF: Auswurffraktion, ESLVM: endsystolische linksventrikuläre Masse, ESV: endsystolisches Volumen, FS: Verkürzungsfraktion, GLS: globale longitudinale Verformung (*global longitudinal strain*), SV: Schlagvolumen (*stroke volume*).

Für die regionale Analyse der Herzfunktion wird der linke Ventrikel in 6 Segmente untergliedert, die sich aus je 8 Messpunkten zusammensetzen. Es erfolgt die kardiale Segmentierung der anterioren und der posterioren Herzwand in ein Herzbasis-orientiertes, ein mittleres und ein

Apex-orientiertes Segment (Abb. 2.9 A). Auch die regionale Analyse wird in kurvenförmiger Darstellung bezugnehmend auf die Deformation (*strain*, in %), die Deformationsrate (*strain rate*, in [1/s]) und die Geschwindigkeit (*velocity*, in [cm/s]) wiedergegeben. Die Berechnung der Parameter beruht auf den Grundlagen der Kontinuumsmechanik unter Berücksichtigung des Eulerschen bzw. Lagrangeschen Deformationsgradienten (Verzerrungstensors) und der endlichen Deformationstheorie (Bauer et al. 2011; Heimdal et al. 1998). Die Sequenzanalyse in PSLAX berücksichtigt sowohl die longitudinale als auch radiale Wandbewegung des Endokards (bzw. des Epikards). Neben den Einzelverläufen der 6 Segmente errechnet sich der mittlere Kurvenverlauf aus dem Mittelwert aller segmentalen Einzelwerte zum jeweiligen Zeitpunkt. Der mittlere Peakwert entspricht somit also nicht dem Mittelwert aller Einzel-Peakwerte.



**Abb. 2.9 STE-basierte regionale Funktionsanalyse des linken Ventrikels**

(A) Schematische Darstellung der Unterteilung des linken Ventrikels in 6 Segmente, davon jeweils 3 definierte Regionen auf anteriorer und posteriorer Ventrikelseite. (B) Beispielhafte longitudinale Verformung des Endokards während drei aufeinanderfolgenden Herzzyklen. Ein Zyklus ist durch die rote Umrandung hervorgehoben. Die Verkürzung jedes Segments ist durch den Kurvenverlauf in der zugehörigen Farbe repräsentiert. Der mittlere Verlauf aller Segmente ist in schwarz dargestellt. Der Peakwert jedes Segments ist durch einen farbigen Punkt hervorgehoben. AA: Anterior Apex (pink), AB: Anterior Basis (dunkelblau), AM: Anterior Mitte (gelb), PA: Posterior Apex (hellblau), PB; Posterior Basis (grün), PM: Posterior Mitte (grau).

#### 2.4.7 Telemetrische Blutdruckmessung

Die Erfassung des arteriellen Blutdrucks, des Pulses und der lokomotorischen Aktivität der Versuchstiere erfolgt mittels Fernmessung (Telemetrie) unter Verwendung eines geeigneten Implantats der Firma DataScience Inc. (DSI). Das Prinzip der Messkörper beruht auf der Weiterleitung von Druckwellen auf das patentierte Gel innerhalb des flüssigkeitsgefüllten Katheters (Brockway et al. 1991). Durch die Übertragung der Sensor-ermittelten Messwerte zur Messplattform gelingt die Parametergewinnung unter physiologischen Bedingungen *in vivo*. Die Implantation des 1,4 g schweren und 1,1 cm<sup>3</sup> großen Katheters erfolgt unter 3K-Narkose und ggf. zusätzlicher Isofluran-Zufuhr analog der Anästhesie des chronischen MI-Modells (siehe 2.4.5.1). Die telemetrischen Messungen finden 7 Tage nach dem operativen Eingriff statt, sodass eine vollständige Regeneration der Maus gesichert ist.

### 2.4.7.1 Katheter-Implantation und telemetrische Messung

Die narkotisierten Versuchstiere (siehe 2.4.5.1) werden in Rückenlage senkrecht zum Operateur auf einer 37°C-temperierten Heizplatte positioniert. Die Körpertemperatur wird während des kompletten chirurgischen Eingriffs mittels Rektalsonde kontrolliert und stabil bei 37°C ± 0,5°C gehalten. Die Narkosetiefe der Mäuse wird anhand des Lid-, Korneal- und Zwischenzehenreflexes überwacht. 30 min nach 3K-Narkose-Einleitung durch i.p. Injektion wird ein Isofluran/Sauerstoff-Gasgemisch (1,0 - 2,0 Vol.-%) über eine murine Atemmaske zugeführt, um die chirurgische Toleranz zu wahren.

Zu Beginn des Eingriffs wird das Fell des Tieres im Brustbereich mithilfe von Enthaarungscreme entfernt und die betroffene Region mit einem Octenidin-haltigen Antiseptikum desinfiziert. Unterhalb des Unterkiefers (submandibulär) wird ein ca. 2,5 cm großer Hautschnitt Richtung Sternum durchgeführt und das darunter liegende Weichgewebe (Fettgewebe, Speicheldrüsen) zur Freilegung der linken *Arteria carotis communis* umpositioniert. Das lateral zur Trachea verlaufende arterielle Gefäß teilt sich an der Karotidgabel in die *Arteria carotis interna* und die *Arteria carotis externa*. An dieser Position wird die *Arteria carotis communis* von umliegenden Gefäßen und Nervenbahnen (insbesondere des *Nervus vagus*) freigelegt. Ein erster chirurgischer Nahtfaden (Handseite 7-0) wird um die Arterie positioniert und kaudal zur Bifurkation irreversibel verknotet. In proximaler Ausrichtung wird eine zweite reversible Ligatur unter Verwendung einer Bulldogklemme gesetzt. Um den Druckkatheter in das Gefäß einzuführen, wird nun im abgeklemmten Gefäßabschnitt (ca. 0,8 cm Distanz zwischen Ligatur eins und zwei) ein medianer Schnitt angesetzt. Das gelgefüllte Schlauchelement wird dann Richtung Aortenbogen vorgeschoben und mit zwei Nahtfäden um das Gefäß fixiert. Zur intrakorporalen Positionierung des Katheter-verbundenen Transmitters wird im rechten Flankenbereich des Versuchstiers eine subkutane Hauttasche mithilfe einer atraumatischen Pinzette geformt. Nachdem der Katheter vollständig subkutan eingeführt ist, findet der Wundverschluss mittels Einzelknopfnähte statt.

Zur postoperativen Schmerzbehandlung erhalten die Tiere bereits im narkotisierten Zustand eine s.c. Injektion von 0,05 - 0,1 mg/kg KG Buprenorphin. Hierfür wird eine 2 ml/kg KG Injektionslösung verwendet (1:6 Verdünnung der Buprenorphin-Stammlösung mit 0,9 % NaCl-Lösung), die gewichtsadjustiert appliziert wird. Zusätzlich erhalten die Versuchstiere an den ersten beiden Tagen nach der Katheter-Implantation das analgetisch wirkende Antipyretikum Paracetamol in einer Dosierung von 1,3 mg/ml p.o. über das Trinkwasser. Insgesamt erfahren die Tiere eine 7-tägige Regenerationsphase zur vollständigen Erholung. In dieser Zeit wird das natürliche Verhalten, die Wundnähte und das Gewicht der Tiere engmaschig kontrolliert.

Die telemetrische Messung an Tag 8 findet im Heimatkäfig, der auf zugehörige Sensorplatten positioniert wird, statt. Der implantierte Sensor wird mittels Magneten aktiviert und die Fernmessung gestartet. Über einen Messzeitraum von 72 h wird die Datenakquisition im 15 min Takt für eine Gesamtdauer von jeweils 5 min durchgeführt.

### 2.4.7.2 Katheter-Entfernung und Reinigung

Nach Beendigung der telemetrischen Messung (siehe 2.4.7.1) werden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> euthanasiert und der implantierte Katheter durch den Einsatz von geeigneten OP-Instrumenten (siehe 2.4.1) aus dem murinen Körper befreit. Nachdem grobe Verklebungen entfernt sind, wird der Transmitter über Nacht in einer 1 % TergazymLösung (siehe 2.4.2) gelagert. Nach 24 h wird das Element gründlich mit VE-Wasser abgespült und verbleibende Geweberückstände manuell entfernt. Es folgt eine zweite Lagerung für 24 h in einer 2 % Glutaraldehydlösung (siehe 2.4.2). Nach erneuter Entfernung der chemischen Lösung unter fließendem VE-Wasser wird zuletzt das Gelniveau im flüssigkeitsgefüllten Katheter überprüft und ggf. aufgefüllt. Bis zur erneuten Implantation verbleibt der gereinigte Messkörper in steriler 0,9 % NaCl-Lösung.

## 2.5 Gewinnung von murinen Kardiomyozyten und Gewebe

### 2.5.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	B0753	Sigma-Aldrich
Ampuwa	PZN 7610894	Fresenius Kabi
Dinatriumphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	30412	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	life technologies
Glucose	G7528	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	60339	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5655	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	S5886	Sigma-Aldrich
Liberase DH Research Grade	05401089001	Roche/Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	63138	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	S5761	Sigma-Aldrich
Perma-Hand Seide (5/0)	K880H	Ethicon
Phenolrot	P5530	Sigma-Aldrich
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Trypsin 2,5 % (10x)	15090046	life technologies
Zellsieb (100 µm)	352360	BD Bioscience

### 2.5.2 Puffer und Lösungen

CaCl <sub>2</sub> (100 mM)		CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	
CaCl <sub>2</sub>	147 mg	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 10ml	dH <sub>2</sub> O	ad 10ml

<b>Perfusionspuffer (Stammlösung)</b>		<b>BDM (500 mM)</b>	
NaCl	13,20 g	BDM	2,52 g
Taurin	7,50 g	dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
HEPES	4,77 g		
NaHCO <sub>3</sub>	2,02 g	<b>Perfusionspuffer (Arbeitslösung)</b>	
KHCO <sub>3</sub>	2,02 g	Perfusionspuffer (Stammlösung)	1960 ml
KCl	700 mg	BDM (500 mM)	40 ml
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	600 mg	Glucose	2,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	214 mg	pH-Einstellung auf 7,46 und steril filtrieren.	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	164 mg	Aliquotierung und Lagerung bei -20°C:	
Phenolrot	24 mg	31x 40 ml (Perfusion)	
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml	31x 22,6 ml (Digestion)	
<b>Stopp-Puffer 1</b>		<b>Stopp-Puffer 2</b>	
Perfusionspuffer (Arbeitslösung)	2,25 ml	Perfusionspuffer (Arbeitslösung)	9,50 ml
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	1,25 µl	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	3,75 µl
FCS	250 µl	FCS	500 µl
<b>Liberase-Lösung</b>		<b>Digestionspuffer</b>	
Liberase DH Research Grade	50 mg	Perfusionspuffer (Arbeitslösung)	22,5 ml
Ampuwa	12 ml	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	2,8 µl
Aliquotierung à 400 µl und Lagerung bei -20°C		Trypsin 2,5 % (10x)	150 µl

### 2.5.3 Isolation von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Die Isolation muriner Kardiomyozyten aus dem Gesamtherz der Versuchstiere dient zum einen der Probenmaterial-Gewinnung für biochemische Untersuchungsmethoden wie z. B. der Protein- und mRNA-Analytik. Zum anderen ermöglicht die Isolationsmethode die Kultivierung adulter Kardiomyozyten *in vitro* für weiterführende Viabilitätsuntersuchungen auf Grundlage von Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) sowie für Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte (Einzelzell-)Messungen. Die Vorgehensweise beruht auf dem ursprünglich publizierten Protokoll (AfCS procedure protocol PP00000125) der *Alliance for Cellular Signaling* (AfCS), einem interdisziplinären Konsortium aus Wissenschaftlern mit dem gemeinsamen Ziel, zelluläre Signalwege in B-Lymphozyten und Kardiomyozyten zu untersuchen (Gilman et al. 2002).

Für die Gewinnung muriner Kardiomyozyten werden zuerst der Perfusions- und Digestionspuffer sowie Stopp-Puffer 1 und 2 (siehe 2.5.2) hergestellt und auf 37°C temperiert. Die Langendorff-Apparatur wird mit dH<sub>2</sub>O gereinigt und mit dem Perfusionspuffer gespült. Das Perfusat wird mithilfe des angeschlossenen Rückflusskühlers bei einer Temperatur von 37°C gehalten. Nach erfolgter Euthanasie des Versuchstiers mittels CO<sub>2</sub>, wird der Thorax zügig eröffnet, die Lungenflügel werden abgetrennt und das murine Herz samt Aortenbogen wird entnommen. In einer PBS-gefüllten Petrischale wird das isolierte Herz von Gefäßrückständen befreit, ohne dabei den Ventrikel oder die Vorhöfe mechanisch zu verletzen. Der Aortenbogen dient als Orientierung und wird kaudal des Truncus brachiocephalicus mit einer feinen Schere

durchtrennt. Mit der verbliebenen, aufsteigenden Aorta wird das Herz auf eine Kanüle gestülpt, mit einem Einzelknoten (Handseide 5-0) fixiert und an die Langendorff-Apparatur angeschlossen. Idealerweise erfolgt die Herzpräparation in einem zeitlichen Fenster von 5 - 10 min, sodass die Herzkontraktion bei der Überführung an das Perfusionssystem noch erkennbar ist. Bei einer Pumprate von 2,5 ml/min wird das Organ nun für 3 min retrograd perfundiert und mit dem Perfusionspuffer gereinigt. In dieser Zeit werden 20 ml des vorbereiteten Digestionspuffers mit 400 µl Liberase-Lösung versetzt. Mit dieser frisch hergestellten Verdauung (Digestionspuffer + Liberase) wird das Herz für weitere 12 min perfundiert. Im Anschluss werden die Vorhöfe und Aortenrückstände vollständig entfernt und der verdaute Ventrikel in 2,5 ml Digestionspuffer und einem 5 ml Becherglas aufgefangen. Mit einer Federschere wird dieser dann für 30 s in kleine Fragmente geschnitten und zuletzt der Stopp-Puffer 1 zugegeben.

Nachfolgende Schritte wurden, sofern die Kardiomyozyten für *in vitro* Analysen isoliert wurden (siehe 2.7), unter der Sterilbank durchgeführt. Ansonsten ist die weitere Durchführung des Protokolls im S1-Labor ohne Laminar-Flow-Kabine möglich. Um die Kardiomyozyten weiter aus ihrem Verbund zu lösen, folgt ein zweiter Schritt, bei dem die Zellsuspension mit einer 5 ml-Stripette für 3 min resuspendiert wird. Die augenscheinlich homogene Suspension wird nachfolgend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mittels eines 100 µm Zellsiebs überführt. Größere Rückstände und Verunreinigungen verbleiben dadurch im Filter. Die 10-minütige Sedimentation der Kardiomyozyten findet nach Überführung der Zellsuspension in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen statt. Zu diesem Zeitpunkt kann der Isolationserfolg visuell mit einem Kontrolltropfen auf einer Petrischale kontrolliert werden. Ein lockeres Pellet, bestehend aus vitalen Kardiomyozyten, setzt sich innerhalb von 10 min ab und der Fibroblasten-haltige Überstand wird vorsichtig abgenommen. Für die Gewinnung adulter kardialer Fibroblasten wird der Überstand erneut für 7 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Kardiomyozyten-reiche Pellet wird mit dem Stopp-Puffer 2 resuspendiert und erneut in eine 10 cm Petrischale überführt. Zur Rückgewinnung der Ca<sup>2+</sup>-Toleranz folgt eine schrittweise Zugabe steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, bis ein physiologisches Level erreicht ist. Insgesamt erfolgt die Ca<sup>2+</sup>-Reinduktion in 5 Schritten. In den ersten drei Schritten wird eine 10 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung in den Volumina 2x50 µl und 1x100 µl zugegeben. Dann folgt die Zugabe von 30 µl einer 100 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung und zuletzt 50 µl derselbigen Ca<sup>2+</sup>-haltigen Lösung. Die Zellsuspension wird erneut für eine Sedimentation von 10 min in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zu Beginn der Sedimentationsphase wird ein kleines Volumen der Zellsuspension abgenommen und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer ermittelt. In der Regel wird bei erfolgreicher Durchführung dieses Protokolls eine Vitalzellzahl von ≥ 1 Millionen stäbchenförmiger Kardiomyozyten erreicht (O'Connell et al. 2007). Die Kardiomyozyten werden entsprechend ihres Verwendungszwecks weiterprozessiert. Für biochemische Analysen kann das Pellet mit flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und bei einer Temperatur von -20°C zwischengelagert werden.

#### 2.5.4 Isolation von Gewebe

Für biochemische oder histologische Untersuchungen ist neben der Isolation kardialer Zellen (siehe 2.5.3) auch die Gewinnung von (murinen und humanen) Organproben von Bedeutung. Grundsätzlich werden die adulten Mäuse mittels CO<sub>2</sub> euthanasiert. Die Organentnahme erfolgt stets durch eine präzise und schnelle Eröffnung der jeweiligen Körperregion unter Verwendung chirurgischer Instrumente. Die Organe werden in eine Petrischale überführt, die gefüllt ist mit eisgekühltem PBS. Dies fördert den Erhalt der Gewebequalität für den Zeitraum der Präparation. Wie bereits bei der Isolation muriner Kardiomyozyten beschrieben (siehe 2.5.3), wird auch bei der Gewinnung des Ventrikels und der Atria eine Langendorff-Perfusion durchgeführt. Durch die retrograde Spülung des Herzens mittels PBS (4°C) werden Blutrückstände und Koagulate aus den Koronargefäßen präzise entfernt. Die weiteren Gewebe der Maus, darunter das Gehirn, die Leber, die Aorta, die Skelettmuskulatur oder das weiße Fettgewebe werden ausschließlich manuell mit PBS gespült. Die Lagerung erfolgt bei -80°C, nachdem die Gewebe in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren wurden.

Die Gewinnung menschlichen Material für wissenschaftliche Zwecke erfolgte durch Genehmigung der Ärztekammer Hamburg (WF-088/18) nach Überprüfung der ethischen Grundsätze, festgelegt durch die Weltärztebund (WMA)-Deklaration von Helsinki. Die humanen linksventrikulären Proben wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Nadja Bork (Zentrum für Experimentelle Medizin, Arbeitsbereich Experimentelle Herz-Kreislaufforschung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) analysiert.

#### 2.6 DNA-Isolation aus Kardiomyozyten und Gewebe

Für den Nachweis einer gezielten Gendeletion durch die Aktivität der  $\alpha$ -MHC-Cre-Rekombinase wurden neben den Kardiomyozyten und dem murinen Herzen noch weitere Gewebe, darunter das Gehirn, die Leber, die Aorta, die Skelettmuskulatur und das weiße Fettgewebe (siehe 2.5.4) isoliert. Die DNA-Gewinnung aus den unterschiedlichen Geweben erfolgte unter Verwendung des *High Pure PCR Template Preparation Kits* der Firma Roche. Die Proben werden mit 200  $\mu$ l des vom Hersteller zur Verfügung gestellten *Tissue Lysis Buffer* und 40  $\mu$ l Proteinkinase K versetzt. Die isolierten Zellpellets werden zusätzlich kurz mithilfe einer Pipette homogenisiert. Danach folgt eine Inkubation über Nacht bei 55°C und 450 rpm auf dem Heizblock. Am nächsten Tag werden die Proben mit 200  $\mu$ l *Binding Buffer* und 100  $\mu$ l Isopropanol versetzt und bei 13000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird in Polypropylen-Filterröhrchen (*High Pure Filter Tubes*) überführt und erneut für 1 min mit 8000 U/min zentrifugiert. Durch die Silica-Beschichtung der Filterröhrchen werden die Nukleinsäuren an die Säulenmatrix gebunden. Es folgen zwei Waschschrte unter Verwendung von 500  $\mu$ l *Washing Buffer* und Zentrifugation für jeweils 1 min bei 8000 U/min. Zuletzt findet die Elution der DNA mittels 200  $\mu$ l *Elution Buffer* bzw. 100  $\mu$ l desselbigen Puffers (für Aorta und Atria) statt. Durch den hohen Tris-Gehalt der Pufferlösung werden die DNA-Silica Bindungen gelöst. Die Konzentration der eluierten DNA wird anschließend am Nanophotometer bestimmt und durch erneuten Einsatz des *Elution Buffers* auf eine Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l eingestellt. Die nachfolgende Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese erfolgen wie in den Abschnitten 2.3.6 und 2.3.7 beschrieben.

## 2.7 Kultivierung adulter Kardiomyozyten

### 2.7.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	B0753	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	life technologies
Glasplättchen 30 mm	10199-874	VWR
Glutamin (200 mM, 10x)	25030-024	life technologies
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	S5886	Sigma-Aldrich
Laminin	354232	Corning
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	63138	Sigma-Aldrich
Modified eagles medium (MEM)	51200-046	Gibco
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	15140122	life technologies
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	11538886	gibco
Zellkulturschale 35 mm	430165	Corning

### 2.7.2 Puffer und Lösungen

#### Hypoxiepuffer

NaCl	6,60 g
Taurin	3,75 g
HEPES	2,38 g
KCl	0,35 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,30 g
CaCl <sub>2</sub>	0,11 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 7,46 und steril filtrieren.  
Aliquotierung und Lagerung bei -20°C

#### Kulturmedium

MEM	20 ml
FCS	1,25 ml
BDM (500mM)	455 µl
Glutamin, 1 %	250 µl
Pen/Strep	230 µl

#### Normoxiepuffer

Hypoxiepuffer	20 ml
Glucose-Lösung (1,1 M)	0,1 ml
FCS	1,0 ml

#### Glucose-Lösung (1,1 M)

Glucose	1,98 g
dH <sub>2</sub> O	10 ml

Steril filtrieren. Aliquotierung und Lagerung bei -20°C

#### BDM (500 mM)

BDM	2,52 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

### 2.7.3 Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro*

Hypoxie und Reoxygenierung- (H/R) *in vitro* bietet die Möglichkeit, das I/R-Geschehen *in vivo* zu simulieren und das Ausmaß der H/R-Schädigung spezifisch am isolierten Zelltyp zu untersuchen (Portal et al. 2013). Das hier verwendete Modell beruht auf den Grundlagen von Portal et al 2013, das speziell für die Anwendung frisch isolierter, myozytärer Primärzellen der Maus entwickelt wurde. Der hypoxische Stimulus resultiert aus der Deprivation von Nährstoffen (Glucose und Serum) und Sauerstoff für einen Zeitraum von 2 h bzw. 4 h. Die Reoxygenierung unter normoxischen Bedingungen schließt sich für eine Gesamtdauer von 17 h an, bevor die Viabilität der Kardiomyozyten mittels Trypanblau-Färbung erfasst wird.

Zunächst findet die Isolation der adulten Kardiomyozyten aus dem murinen Herzen, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, statt. Das gewonnene Zellpellet wird mittels Hypoxiepuffer (siehe 2.7.2) resuspendiert und auf eine Zellzahl von ca. 125.000 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wird auf eine 35 mm Zellkulturschale ausgebracht, die vorab mit 37°C-warmem PBS gespült wurde. Es ist zu beachten, dass die Kardiomyozyten aufgrund ihrer Morphologie sehr schnell sedimentieren. Nach einer Sedimentationszeit von 10 min wird das Medium abgenommen und die Zellen mit Hypoxiepuffer gewaschen. Intakte Kardiomyozyten sind initial adhären, sodass durch einen sanften Waschschrift die Entfernung bereits toter, morphologisch kugelförmiger Zellen möglich ist. Zellen, die das H/R-Protokoll durchlaufen, werden im nächsten Schritt mit 1 ml Hypoxiepuffer versetzt, der über Nacht im Inkubator unter hypoxischen Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub>, 94 % N<sub>2</sub>) äquilibriert wurde. Kontrollzellen werden entsprechend mit 1 ml Normoxiepuffer versetzt und ausschließlich unter normoxischen Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 37°C, pH 7,4) kultiviert. Zügig werden die Zellen in den jeweiligen Brutschrank platziert und verweilen für eine Dauer von 2 h bzw. 4 h unter Hypoxie (Kontrollzellen unter Normoxie). Die Reoxygenierung der Hypoxie-exponierten Zellen erfolgt durch die Zugabe von 1 ml Normoxiepuffer, der mit der doppelten Menge an Glucose und FCS versetzt wurde. Durch diese Maßnahme wird letztlich ein Substratgehalt von 5,5 mM Glucose und 5 % FCS gewährleistet. Aufgrund der abnehmenden Adhärenz der Myozyten findet zu diesem Zeitpunkt kein weiterer Mediumwechsel statt. Die Zellen werden für weitere 17 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Kontrollzellen werden entsprechend mit zusätzlich 1 ml Normoxiepuffer versetzt und ebenfalls für 17 h inkubiert.

Das myozytäre Überleben nach H/R *in vitro* wird mittels Trypanblau-Färbung ermittelt. Durch Zugabe von 200 µl des Zellfarbstoffs werden nicht-intakte Zellen mit geschädigter Plasmamembran blau gefärbt. Für die visuelle Erfassung unter dem Lichtmikroskop (10x Vergrößerung) werden die Zellkulturschalen in sechs identisch große Bereiche unterteilt. Durch die genormte Ausrichtung unter dem Mikroskop (horizontal: 45, vertikal: 140) wird stets der gleiche Bildausschnitt evaluiert. Im Mittel werden 800 Kardiomyozyten pro Schale ausgezählt und die Vitalzahl als prozentualer Wert der stäbchenförmig-nichtgefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt. Die Vitalzahl der Normoxie-behandelten Kontrollzellen wird dann als 100 % gehandhabt und somit die Zunahme an Zelltod durch H/R prozentual berechnet.

## 2.7.4 Virale Transduktion von Kardiomyozyten für $[K^+]_i$ -Messungen

Zur Erfassung des intrazellulären Kalium-Haushalts  $[K^+]_i$  in isolierten Kardiomyozyten kommt die Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte Fluoreszenz-Mikroskopie zum Einsatz. Die von Bischof et al. 2017 entwickelten Biosensoren *genetically encoded potassium ion indicators* (GEPiI) erfassen quantitativ die Kalium  $[K^+]_i$ -Konzentration in unterschiedlichen Zellkompartimenten und ermöglichen die Visualisierung der  $[K^+]_i$ -Dynamik an der einzelnen Zelle (Bischof et al. 2017).

Die Untersuchungen zur  $[K^+]_i$ -Homöostase in adulten Kardiomyozyten *in vitro* beruhen auf der transienten Expression des FRET-basierten Biosensors NES I<sub>c</sub>-LysM GEPiI 1.0. Um dies zu realisieren, werden die isolierten Kardiomyozyten (siehe 2.5.3) einer viralen Transduktion unterzogen. Der für den Gentransfer verwendete Adenovirus Serotyp 5 (AV5) weist einen breiten Tropismus auch für ausdifferenzierte Zellen wie beispielsweise Kardiomyozyten auf. Der zu übertragende Nukleinsäureabschnitt unterliegt der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV)-Promotors im viralen Vektor (pAV[Exp]-CMV>cyto\_NES\_I<sub>c</sub>-LysM\_GEPiI), der mithilfe der Design-Plattform für Vektoren *VectorBuilder* generiert wurde.

Die isolierten Kardiomyozyten werden für die virale Transduktion in MEM-basiertem Kulturmedium auf eine Zelldichte von ca.  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt und in 35 mm Zellkulturschalen ausgebracht. Diese beinhalten Laminin-beschichtete Glasplättchen ( $\varnothing$  30 mm), die für die finale FRET-Messung (siehe 2.9.4) benötigt werden. Die Laminin-Beschichtung erfolgt bereits am Vortag in einer Konzentration von 12,5  $\mu$ g/ml. In Abhängigkeit der geplanten Anzahl wird ein Mastermix, bestehend aus 7,5  $\mu$ l der Laminin-Stammlösung und 1 ml PBS pro Einheit, berechnet und aufgetragen. Nach erfolgter Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Glasplättchen in zwei Waschschrritten mit PBS gereinigt und die Primärzellen ausgebracht. Die murinen Zellen werden zur Äquilibrierung für 1 h im Brutschrank inkubiert. Direkt im Anschluss folgt die virale Transduktion mit einer Multiplizität der Infektionen (MOI) von 100, die das Verhältnis der Viruspartikel zu den vorhandenen Zielzellen beschreibt. Um das zu pipettierende Volumen an Viruslast zu berechnen, wird neben der Zelldichte und der MOI ein dritter Parameter, die Infektionseinheiten der Virusprobe, berücksichtigt. Als IFU/ml (*infectious units/ml*) gekennzeichnet, gibt diese Größe die Anzahl vitaler bzw. infektiöser Partikel wieder, die in der jeweiligen Charge vorliegen. Beispielsweise liegt der virale Titer bei der für diese Arbeit verwendeten Charge bei  $>10^{10}$  IFU/ml.

$$V_{\text{Viruslast}} = \frac{\text{MOI} \cdot \text{Zelldichte}}{\text{IFU/ml}}$$

### Formel 2.3 Berechnung des benötigten Volumens an Viruslast zur viralen Transduktion adulter Kardiomyozyten

Eine geeignete myozytäre Expressionsstärke des  $K^+$  Sensors zeigt sich nach 24 h, wenn die isolierten Kardiomyozyten im Verhältnis 1:100 mit Adenoviruspartikeln (Serotyp 5), die für den Biosensor NES I<sub>c</sub>-LysM GEPiI 1.0 codieren, transfiziert werden. Das dafür benötigte Volumen berechnet sich aus der Zelldichte der ausgebrachten Kardiomyozyten, der benötigten MOI für den kardialen Zelltyp und der IFU der Viruscharge. IFU/ml: infektiöse Einheiten pro ml, I<sub>c</sub>: *low charge*, MOI: Multiplizität der Infektionen, NES: *nuclear export sequence*.

Für die virale Transduktion der Kardiomyozyten wird erneut ein Mastermix hergestellt, der sich aus dem errechneten Virusvolumen (siehe Formel 2.3) und jeweils (100 µl -  $V_{\text{Viruslast}}$ ) Kulturmedium pro Einheit zusammensetzt. Somit werden pro Zellkulturschale 100 µl Virusmenge in einer MOI von 100 pipettiert und über Nacht unter normoxischen Bedingungen im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 37°C) inkubiert. Die Transduktionseffizienz steht in großer Abhängigkeit zur Virusqualität, d. h. wiederholende Tauprozesse der Viruscharge sollten durch geeignete Aliquotierung vermieden werden. Zudem sollte die Lagerung des Virus bei -80°C eine Dauer von 1 Jahr nicht überschreiten.

## 2.8 HEK293-Zellkultur

*Human Embryonic Kidney* (HEK)-Zellen zählen zu den gängigsten immortalisierten Zelllinien im Labor (Thomas & Smart 2005). Die künstlich transformierten Zellen, ursprünglich gewonnen aus humanen embryonalen Nierenzellen (Graham et al. 1977), zeichnen sich aus durch eine hohe Robustheit, eine einfache Handhabung und ein breites Anwendungsfeld. Um den zellulären Einfluss des Slack-Kanals *in vitro* zu studieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit HEK293-Zellen verwendet, die das humane *KCNT1*-Gen überexprimieren (HEK293-hKCNT1). Die stabil-transfizierte Zelllinie wurde von Prof Dr. Achim Schmidtko, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Goethe Universität Frankfurt, im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie wurde von der wissenschaftlichen Organisation SB Drug Discovery mit Sitz in Großbritannien hergestellt.

### 2.8.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified eagles medium (DMEM)	42430-035	Gibco
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	life technologies
Geneticin (G418)	A1720-5G	Sigma-Aldrich
Glasplättchen 30 mm	10199-874	Bioprotechs Inc., VWR
Isopropanol	9866.2	Carl Roth
Kryogefäße CryoTube 1,8 ml	363632	Nunc
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	15140122	life technologies
PolyJet In Vitro Transfection Reagent	#SL100688	SignaGen
Thermo Scientific Mr. Frosty Gefrierbehälter	10110051	fisher scientific
10x Trypsin	15400054	Gibco
Zählkammer C-Chip, Neubauer	631-1098	NanoEnTek
Zellkulturschale 35 mm	430165	Corning

### 2.8.2 Puffer und Lösungen

G418 (50 mg/ml)		20 % DMSO/Kryo-Medium	
G418	300 mg	DMSO	1 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 6 ml	Kulturmedium (jeweils zugehörig)	4 ml
Steril filtrieren und Lagerung bei -20°C			

<b>Kulturmedium (HEK293)</b>		<b>Kulturmedium (HEK293-hKCNT1)</b>	
DMEM	450 ml	DMEM	450 ml
FCS	50 ml	FCS	50 ml
Pen/Strep	5 ml	Pen/Strep	5 ml
		G418 (50 mg/ml)	6 ml

### 2.8.3 Kultivierung und Passagierung der HEK293-Zelllinien

Das Arbeiten mit kultivierten Zellen (Zelllinien oder Primärzellen) erfolgt grundsätzlich unter der Sterilbank und unter Einhaltung aseptischer Bedingungen. Die Kultivierung der Zellen findet in Inkubatoren bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % statt. Alle Medien, die verwendet werden, sind grundsätzlich auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

Die Kultivierung der HEK293-hKCNT1- und HEK293-Kontrollzellen erfolgt in 75 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen unter Verwendung des zugehörigen Kulturmediums (siehe 2.8.2). Die stabil-transfizierte Zelllinie wurde bei der Integration des hKCNT1-Gens mit einem G418-Selektionsmarker versehen. Der Zusatz von G418 im Zellkulturmedium garantiert den Erhalt von ausschließlich erfolgreich transformierten Zellen in Kultur.

Die kultivierten Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 90 % via Trypsinierung passagiert. Vorbereitend wird das verbrauchte Medium abgezogen und die Flasche zweifach mit PBS gewaschen. Bei der verwendeten Flaschengröße von 75 cm<sup>3</sup> wird anschließend ein Volumen von 2 ml Trypsin zugegeben. Nach kurzer Inkubationszeit von 2-3 min im Brutschrank werden die ursprünglich adhärenen Zellen durch kräftiges Klopfen gegen die Handfläche vollständig abgelöst. Durch Zugabe von 8 ml FCS-haltigem Kulturmedium wird die enzymatische Aktivität des Trypsins inaktiviert. Mittels Stripette wird das Gesamtvolumen (10 ml) in der Zellkulturflasche mehrfach auf- und abpipettiert, bis eine deutliche Trübung erkennbar ist. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Im gleichen Zug wird ein kleines Volumen in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt, einer 1:10 Verdünnung unterzogen und die Zellzählung in einer Neubauerkammer (10 µl Zugabe) durchgeführt. Das nach der Zentrifugation entstandene Zellpellet wird basierend darauf auf ein definiertes Volumen eingestellt und in neue Zellkulturflaschen zur Kultivierung bzw. Zellkulturschalen zur Transfektion (siehe 2.8.5) überführt. Alle zwei bis drei Tage bis zur erneuten Passagierung wird ein Mediumwechsel bei den Zellen durchgeführt. Dazu wird das verbrauchte Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

### 2.8.4 Kryokonservierung und Auftauprozess

Die Langzeitlagerung der HEK293-Zelllinien erfolgt in Kryocontainern bei einer Temperatur < -80°C, bei der die Stoffwechselfvorgänge der Zellen ohne Verlust der späteren Vitalität pausiert werden. Entscheidend für diese Lagerung ist die fachgerechte Kryokonservierung unter Berücksichtigung möglicher Zellschädigungsprozesse wie beispielweise osmotische Effekte und intrazellulärer Eisbildung.

Für die Kryokonservierung werden 0,5 ml einer Zellsuspension (10x10<sup>6</sup> Zellen/ml Kulturmedium) in einem Kryoröhrchen vorgelegt. Um einer Kristallbildung während des

Einfrierprozesses entgegenzuwirken, werden weitere 0,5 ml eines 20 % DMSO/Kryo-Mediums (siehe 2.8.2) zugesetzt. In einem Isopropanol-haltigen Gefriercontainer, der einen kontrollierten Einfrierprozess von  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sichert, werden die Zellen für 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert, bevor die Zellen für die Langzeitlagerung in einen Kryocontainer transferiert werden.

Für den Auftauprozess durchlaufen die Zellen nun rückläufig die ursprünglichen Stationen der Kryokonservierung. Nach der Entnahme der Kryogefäße aus dem Kryocontainer werden die Zellen also zuerst in einem Gefriercontainer bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 24 h gelagert. Für den eigentlichen Auftauprozess wird die Zellsuspension anschließend für 3 min im Wasserbad erwärmt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit zügig 9 ml Kulturmedium verdünnt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wird der DMSO-haltige Überstand verworfen, das Zellpellet in weiteren 10 ml des zugehörigen Kulturmediums resuspendiert und in eine 75 cm<sup>3</sup>-Flasche zur Kultivierung überführt.

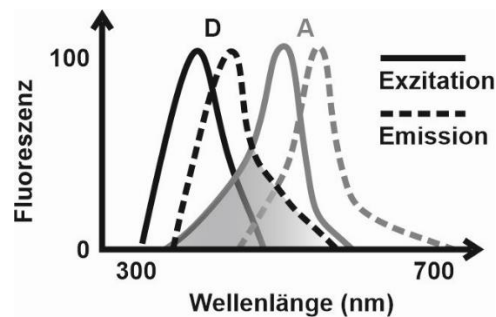
### **2.8.5 Transfektion der HEK293-Zelllinien für $[\text{K}^+]_i$ -Messungen**

Zur Einschleusung der GEPII-codierenden Fremd-DNA in die immortalisierte Wirtszelle (HEK293-hKCNT1 und HEK293) wird das nicht-virale Verfahren der Transfektion *in vitro* eingesetzt. Unter Verwendung kationischer Polymere wird die zu transportierende Plasmid-DNA in Vesikel verpackt und durch Endozytose in die Zielzelle geschleust (Felgner & Ringold 1989). Die Transfektion der HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen wird mithilfe des Transfektionsreagens *PolyJet In Vitro DNA Transfection Reagent* der Firma SignaGen Laboratories durchgeführt unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls zur Transfektion adhärenter Zellen. Als Expressionsvektor dient ein pcDNA 3.1 (-) Plasmid, das für die DNA-Sequenz des jeweiligen Biosensors codiert.

Die zu transfizierenden Zellen liegen in 35 mm Zellkulturschalen vor, ausgebracht auf einem 30 mm Glasplättchen, welches für die spätere FRET-Messung entnommen wird. 1h vor der geplanten Transfektion wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Pro zu transfizierenden Ansatz wird ein Mastermix vorbereitet, bestehend aus dem Transfektionsreagenz (je 3  $\mu\text{l}$ ) und der Plasmid-DNA (je 1  $\mu\text{g}$ ). Zur Einschleusung des im Cytosol vorliegenden Biosensors wurde beispielweise das Plasmid pcDNA3.1 (-) NES Ic-LysM GEPII 1.0 verwendet mit einer Konzentration von 3,127  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Beide Komponenten werden in einem ersten Schritt mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  Serum-freiem DMEM-Kulturmedium verdünnt. Danach wird das verdünnte Transfektionsreagenz der ebenfalls verdünnten Plasmid-Lösung zugeführt und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Die Reihenfolge der Mastermix-Zusammenführung ist entscheidend und stets in dieser Form durchzuführen. Bei Zimmertemperatur folgt eine Inkubationszeit von 15 min zur DNA-Polymerkomplex-Bildung. Im Anschluss werden je 50  $\mu\text{l}$  der Transfektionsreagenz/DNA-Mischung tropfenweise auf die Zellen pipettiert und dabei die Zellkulturschale sanft in Form einer Acht geschwenkt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 6-8 h wird das PolyJet/DNA-haltige Medium entfernt und durch frisches, Serum-haltiges Kulturmedium ersetzt. Die Zellen verbleiben über Nacht im Inkubator und sind nach insgesamt 24 h für die FRET-basierte  $[\text{K}^+]_i$ -Messung (siehe 2.9.6) einsetzbar.

## 2.9 FRET-basierte Analytik

Der von Theodor Förster im Jahr 1946 entdeckte physikalische Prozess des (Förster-) Resonanzenergietransfers beschreibt die strahlungsfreie Energieübertragung (Abb. 2.10) eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor, D) auf ein zweites, sich in unmittelbarer Nähe befindenden Akzeptor-Chromophors (A) (Sun et al. 2011). Aufgrund der hohen Sensitivität im Nanometerbereich hat sich die FRET-basierte Analytik als wertvolle Technik in der Zellbiologie und der Biochemie etabliert (Clegg 1995).



**Abb. 2.10 Das FRET-Prinzip**

Schematische Darstellung des FRET-Prinzips, was den nicht-strahlenden Energietransfer eines Donors D (schwarz) auf ein Akzeptor A (grau) durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung beschreibt. D und A befinden sich dafür in unmittelbarer Nähe zueinander (1 - 10 nm). Neben der räumlichen Nähe liegt außerdem eine deutliche Überlappung des D-Emissionsspektrums und des A-Exzitationsspektrums vor (als graue Fläche dargestellt). Das Schema wurde modifiziert nach (Sun et al. 2011).

Die von Bischof et al. 2017 entwickelten Sensoren machen sich diese Technik zu eigen und sind mit den fluoreszierenden Proteinen mseCFP (blau) und cpV (gelb) ausgestattet. Das Rückgrat der GEPIIs bildet das bakterielle  $K^+$ -bindende Protein (Kbp), bestehend aus einer  $K^+$ -bindenden BON-Domäne (*bacterial OsmY and nodulation*) und einem Lysin-Motiv (LysM) (Ashraf et al. 2016). Wird  $K^+$  durch den Sensor gebunden, interagieren diese beiden Domänen, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Gesamtkonstrukts und zu einer FRET-basierten Energieübertragung der gekoppelten Fluorophore kommt (Bischof et al. 2017).

Um diese Methodik für die  $[K^+]_i$ -Messung an lebenden Zellen in 2D Kulturen anzuwenden, ist ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Observer Z1, Carl Zeiss) erforderlich. Dieses wiederum ist mit einem geeigneten Objektiv (Objective „Fluar“, 40X/30 Oil M27, Carl Zeiss) ausgestattet. Zur Anregung der Biosensoren benötigt es eine Leuchtdiode (LED) (OMNICRON LedHUB High-Power LED Light Engine) als Lichtgenerator mit einer Anregungswellenlänge von 455 nm. Mithilfe eines austauschbaren Bandbreitenfilters (AHF Analysentechnik) wird das Anregungslicht auf einen Wellenlängenbereich von  $427 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  getrimmt. Das Emissionslicht wird simultan auf zwei unterschiedlichen optischen Kanälen bei 475 nm (mseCFP) und 530 nm (cpV/FRET) aufgenommen. Dies gelingt mit einem Strahlenteiler (Optosplitt II, Teledyne Technologies Inc.), der wiederum mit einem dichroitischen Spiegel ausgerüstet ist und durch seine Glasbeschaffenheit nur selektiv Wellenlängen passieren lässt. Die Datenaquisition erfolgt mittels geeigneter wissenschaftlicher Kameraausstattung (pco.panda 4.2 bi sCMOS camera, PCO).

Für die extrazellulären  $K^+$ -Messungen ( $[K^+]_{ex}$ ) im Überstand von Zellsuspensionen benötigt es ein Mikroplatten-Photometer (Tecan Infinite F200 Pro, Tecan), der ebenfalls mit dichroitischen Filtern für CFP und YFP bzw. FRET ausgestattet ist.

### 2.9.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Aminosäuren (MEM Amino Acids Solution)	11130051	Thermo Fisher
Dinatriumphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	4981.1	Carl Roth
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Fetales Kälberserum (FCS)	10099141	life technologies
GEPII 1.0, recombinant		NGFI
Glasplättchen 30 mm	10199-874	Bioprotechs Inc., VWR
Glucose	G7528	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	P0662	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid ( $CaCl_2$ )	S5886	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	M8266	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4$ )	63138	Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat ( $NaHCO_3$ )	S6014	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Perfusionskammer PC30		NGFI
Perfusionssystem, halbautomatisch		NGFI
Taurin	T0625	Sigma-Aldrich
Vitamine (MEM Vitamin Solution 100x)	11120052	Thermo Fisher

### 2.9.2 Pharmakologische Modulatoren

Substanz	Zielkonzentration	Bestellnummer	Hersteller
Bithionol	10 $\mu$ M	31622	Supelco
Chinidin	1 mM	Q3625	Sigma-Aldrich
Clofilium	100 $\mu$ M	C2365	Sigma-Aldrich
Digitonin	50 $\mu$ M	D5628	Sigma-Aldrich
Gramicidin	15 $\mu$ M	G5002	Sigma-Aldrich
Monensin	10 $\mu$ M	M5273	Sigma-Aldrich
Niclosamid	1 $\mu$ M/10 $\mu$ M	N3510	Sigma-Aldrich

Die Substanzen werden als Sammlösungen in hoher Molarität (10 - 15 mM) gelöst und mit dem jeweiligen Untersuchungspuffer zur Anwendung auf die Zielkonzentration eingestellt. Bei den Modulatoren Chinidin, Bithionol, Digitonin und Niclosamid handelt es sich um schwerlösliche Substanzen, die mit DMSO auf eine 10 mM Stammlösung eingestellt und bei einer Temperatur von  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Dies gilt ebenso für das  $K^+$ -Ionophor Gramicidin, das auf eine 15 mM Stammlösung eingestellt wird. Die wasserlöslichen Pharmaka Monensin

und Clofilium werden direkt mit dH<sub>2</sub>O gelöst, die Lagerungszeit ist hier allerdings auf eine Versuchsreihe begrenzt.

### 2.9.3 Puffer und Lösungen

<b>Äquilibrationpuffer (HEK293)</b>		<b>Untersuchungspuffer I</b>	
CaCl <sub>2</sub>	0,22 g	CaCl <sub>2</sub>	0,22 g/l
Glucose	1,80 g	Glucose	1,80 g
HEPES	2,40 g	HEPES	2,40 g
KCl	0,60 g	MgCl <sub>2</sub>	0,10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06 g	NaCl <sub>2</sub>	8,00 g
MgCl <sub>2</sub>	0,10 g	dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
NaCl	8,00 g	pH-Einstellung auf 7,45 mit NaOH	
NaHCO <sub>3</sub>	0,22 g	<b>Untersuchungspuffer II</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 g	NaCl	6,60 g
Aminosäuren	0,2 %	Taurin	3,75 g
Vitamine	0,1 %	HEPES	2,38 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	KCl	0,35 g
pH-Einstellung auf 7,45 mit NaOH		MgSO <sub>4</sub>	0,30 g
		CaCl <sub>2</sub>	0,11 g
		dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
		pH-Einstellung auf 7,45 mit NaOH	

### 2.9.4 [K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub> Messungen an Kardiomyozyten

Für die Erfassung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Dynamik ([K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub>) wird der rekombinante Sensor GEPII 1.0 mit einer erwarteten EC<sub>50</sub> von 0,42 nM (Bischof et al. 2017) genutzt. Durchgeführt werden die Messungen an einem Mikroplatten-Photometer unter Verwendung von Zellkulturgeeigneten, geschwärzten 96-Well Platten mit flachem, durchsichtigem Boden. Die Exzitation findet bei einer Wellenlänge von 430 ± 20 nm statt und die Emission des GEPII 1.0 wird bei den beiden Wellenlängen 485 ± 20 nm (msecFP) und 535 ± 25 nm (FRET/cpV) erfasst. Das FRET-Ratio berechnet sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzen FRET(YFP)/CFP.

Für die Funktionsanalyse des Sensors wird ein zellfreies System gewählt mit klar definierter K<sup>+</sup>-Konzentration beginnend bei 0,01 mM bis zu 100 mM. Dafür wird eine 200 mM K<sup>+</sup>-Stammlösung mit dem Untersuchungspuffer I (Einwaage KCl: 15 g/l) hergestellt und in systematischen Schritten (Zielkonzentrationen in mM: 20; 2; 0,6; 0,2; 0,02) verdünnt. Die finale Sensorkonzentration des GEPII 1.0 liegt bei 200 nM und wird in Abhängigkeit der jeweiligen Charge ebenfalls mit dem Untersuchungspuffer I auf eine erste Konzentration von 400 nM verdünnt. Ein Gesamtvolumen von 100 µl/Well wird vorgelegt, welches sich aus 50 µl der jeweiligen K<sup>+</sup>-haltigen Lösung und 50 µl einer 400 nM Sensorstammlösung zusammensetzt. Bei diesem Versuchsaufbau ist eine finale 1:2 Verdünnung im Well zu beachten.

Für die zellbasierten Untersuchungen mit murinen Kardiomyozyten und der Erfassung des extrazellulären K<sup>+</sup>-Gehalts wird die Isolation der Primärzellen, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in Orientierung an Bischof et al. 2017 mit dem

Untersuchungspuffer I auf eine Dichte von  $8 \cdot 10^5$  Kardiomyozyten/ml eingestellt und jeweils 50  $\mu\text{l}$  (Gesamtzellzahl:  $4 \cdot 10^4$ ) pro Well vorgelegt. Insgesamt wird bei den zellbasierten Messungen ein Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  eingesetzt, d. h. die weiteren Komponenten „Sensor“ und „Modulator“ werden à 50  $\mu\text{l}$  zupipettiert.

Zur Untersuchung des absoluten  $\text{K}^+$ -Gehalts in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten werden die Zellen mit Digitonin bei einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  permeabilisiert. Eine Fluoreszenz-basierte Messung nach Digitonin-Zugabe erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in h: 0, 1, 2, 4, 6, 24) und maximal 24 h nach der Zellisolation. Während der Inkubationszeiten werden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und normoxischen Bedingungen gelagert. Es ist eine 1:3 Verdünnung beider Komponenten „Modulator“ und „Sensor“ zu berücksichtigen. Somit wird eine 150  $\mu\text{M}$  Digitoninlösung und eine 600 nM Sensorlösung mit Untersuchungspuffer I vorbereitet und jeweils in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  zugegeben.

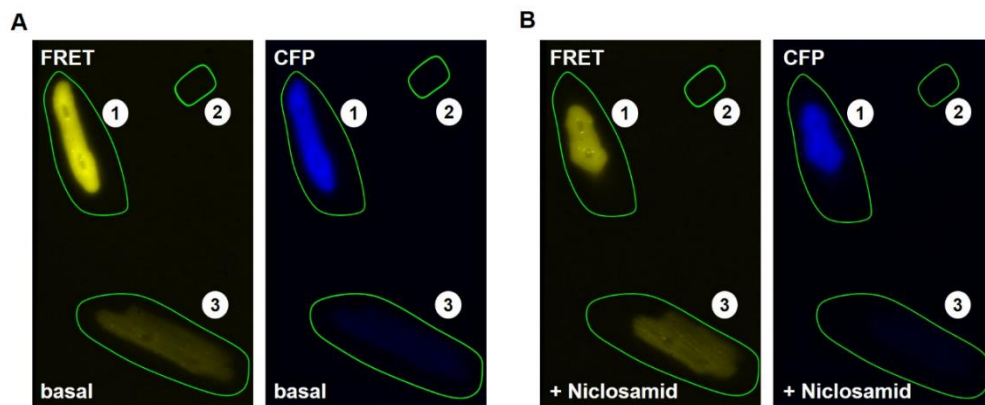
Die Modulation des Slack Kanals erfolgt mit den Aktivatoren Niclosamid und Bithionol. Die Zellen werden jeweils mit einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  stimuliert, entsprechend werden Stammlösungen beider Komponenten in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  vorbereitet und in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  zupipettiert. Ebenso wird das identische Volumen einer 600 nM-Sensorlösung vor der Messung hinzugefügt. Bei jeder Präparation und Messreihe werden Kontroll-Well mitgeführt, die dem identischen technischen Protokoll ausgesetzt und mit zusätzlich 50  $\mu\text{l}$  reinem Medium anstatt Modulatorlösung versetzt werden.

### **2.9.5 $[\text{K}^+]_i$ Messungen an Kardiomyozyten**

Die  $[\text{K}^+]_i$ -Messungen an adulten Kardiomyozyten findet nach erfolgter viraler Transduktion und Expression des Sensors cyto lc-LysM GEPII 1.0 statt (siehe 2.7.4). Die Laminin-beschichteten Plättchen mit den adhärenen Primärzellen werden nach 16 - 24 h post-Transduktion in eine Perfusionskammer gespannt und an ein halbautomatisches, Gravitations-gesteuertes Perfusionssystem angeschlossen. Aufgrund der Fragilität des Zelltyps findet bei den Primärzellen keine Äquilibration bei RT statt. Stattdessen werden die Zellen direkt an die FRET-Apparatur (siehe 2.9) angeschlossen und mit dem FBS-freien Untersuchungspuffer II (siehe 2.9.3) bei mäßiger Flussrate, d. h. geringem Scherstress, umspült. Die Adhärenz der Kardiomyozyten ist reduziert, wenn die Vitalität abnimmt. Es ist damit zu rechnen, dass tote Zellen abgetragen und durch die Bildaufnahme gespült werden. Um ein übermäßiges Auftreten dieser Artefakte zu vermeiden, sollte die Gesamtmessdauer unter Perfusion bei max. 15 min liegen.

Nach einer Baseline-Aufnahme von 200 s werden die Zellen mit einer frisch hergestellten 10  $\mu\text{M}$ -haltigen Niclosamid-Untersuchungslösung II gespült. Charakteristischerweise zeigen die Kardiomyozyten Genotyp-unabhängig ein ausgeprägtes Kontraktionsmuster einhergehend mit einer Verkürzung der Sarkomerlänge unter Erhalt der Zellvitalität für den angegebenen Messzeitraum. Während der gesamten Messung werden die Zellen mit einer Belichtungszeit von 200 ms und einem Aufnahmeintervall von 3 s vermessen unter Verwendung des Transmissionsfilters 4 (40 %) und manueller Regulation der Extinktion bei 15 %. Die Zellen werden somit einer Lichtintensität von ca. 90 mW ausgesetzt.

Die Transduktionseffizienz bzw. -intensität (Abb. 2.11) kann deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen aufweisen. Aus diesem Grund wird eine Setup-spezifische *threshold*-Intensität festgelegt, die erreicht werden muss, damit die Zelle in die statistische Auswertung eingeht. Kardiomyozyten, die während der Messung sterben, werden grundsätzlich aus der Statistik ausgeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten ca. 80 % aller gemessenen Zellen statistisch berücksichtigt werden. Die Datenaquisition erfolgt mit der Software VisiView der Firma Visitron. Es wird die FRET-Ratio ermittelt, welche sich aus der Division FRET (YFP)/CFP errechnet. Zu berücksichtigen ist das Hintergrundsignal (Abb. 2.11), das vorab jeweils vom gemessenen Fluorophor-Signal subtrahiert wird. Außerdem findet durch die regelmäßige Belichtung während der Messung ein „Ausbleichen“ (*bleaching*) des Sensors und somit eine kontinuierliche Abnahme des Signals statt. Mithilfe der Software GraphPad Prism 9 wird anhand der Baseline-Messung eine Regressionsgerade berechnet, um diesen technischen Faktor zu korrigieren und anschließend die statistische Analyse durchzuführen.



**Abb. 2.11 Positionierung der *regions of interest* (ROIs) für die  $[K^+]_i$ -Messung am Kardiomyozyt**  
 Repräsentatives Beispiel zur Darstellung der variablen Transduktionseffizienz von Kardiomyozyten. Während Zelle (1) erfolgreich transduziert und statistisch auswertbar ist, erreicht Zelle (3) die Setup-spezifische *threshold*-Intensität für eine statistische Berücksichtigung nicht. Die *regions of interest* (ROIs) (grün) werden unter Basalbedingungen breiter als die Zellmembran positioniert (A) um die morphologische Änderung und Kontraktionsbewegung im Laufe einer Messung z.B. durch pharmakologische Stimulation mit Niclosamid (B) zu erfassen. Das Hintergrundsignal wird durch Aufnahme einer zusätzlichen ROI (2) berücksichtigt. Die zellspezifischen Fluorophor-Signale FRET und CFP werden durch Subtraktion des Hintergrundsignals mathematisch korrigiert.

### 2.9.6 $[K^+]_i$ Messungen an HEK293 und HEK293-hKCNT1 Zellen

Um die intrazelluläre Dynamik von  $K^+$  in den Surrogatzellen HEK293-hKCNT1 und den HEK293-Kontrollzellen via FRET-basierter Analytik zu untersuchen, werden die Zellen vorab, wie in Kapitel 2.8.5 beschrieben, für die Expression des Ic-LysM GEP11 1.0 transfiziert. 24h nach erfolgter Transfektion werden die Zellen 30 min vor dem geplanten Messbeginn lichtgeschützt bei RT äquilibriert. Dafür wird das FBS-haltige Kultivierungsmedium abgenommen und durch 2ml Äquilibrationpuffer (siehe 2.9.3) ersetzt. Nachdem das Zellplättchen in die Perfusionskammer eingespannt ist, findet die anschließende FRET-Messung der HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen mit dem Untersuchungspuffer I (siehe 2.9.3) statt. Mithilfe des halbautomatischen Perfusionssystems der Firma NGFI werden die Zellen in gleichbleibendem Durchfluss während der Messung umspült. Die

pharmakologische Modulation der HEK293-Zellen erfolgt im Anschluss an eine 3 bis 5-minütige Baseline-Messung. Wie in Kapitel 2.9.2 tabellarisch dargestellt, werden die Modulatoren auf ihre Zielkonzentration mit dem Untersuchungspuffer I eingestellt und die Zellen damit gespült. Gramacidin dient der Verifikation der Biosensorfunktionalität mit dem Ziel, die Zellen zu permeabilisieren. Entsprechend werden diese für 10 min in einer 15 µM Gramacidin-Lösung inkubiert und erst danach an die FRET-Apparatur angeschlossen. Die Datenaquisition aller Messreihen erfolgt in gleichbleibenden Zeitintervallen bei einer Belichtungszeit von 200 ms. Durch die Wahl des Transmissionsfilters (Filter 4, 40 %) und die manuelle Regulation der Extinktion (3 %) werden die Zellen letztlich bei einer Leistung von ca. 18 mW vermessen. Zur Datenanalyse und Hintergrundkorrektur wird erneut die Software VisiView der Firma Visitron genutzt. Die *bleaching*-Korrektur und statistische Analyse wird mittels GraphPad Prism 9 durchgeführt.

## 2.10 RNA-Analytik

### 2.10.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
96-Well-PCR-Platte (Low Multiwell)	MLL-9601	Bio-Rad
β-Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth
Chlorophorm	372978	Sigma-Aldrich
DEPC-H <sub>2</sub> O	T143	Carl Roth
DNase I	04716728001	Roche
Ethanol absolute	32205	Sigma-Aldrich
iScript cDNA Synthesis Kit	17008891	Bio-Rad
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
NucleoSpin® RNA Kit	740955.250	Macherey-Nagel
peqGold RNAPure	30-1010	Peqlab
Primer		Eurofins
SsoAdvanced Universal SYBR®Green Supermix	1725274	Bio-Rad
Versiegelungsfolie Microseal®B'	MSB-1001	Bio-Rad

### 2.10.2 Lösungen und Primer

70 % V/V Ethanol		75 % V/V Ethanol	
Ethanol absolute	35 ml	Ethanol absolute	37,5 ml
dH <sub>2</sub> O	16,65 ml	dH <sub>2</sub> O	14,05 ml

Zielgen	Primertyp	Primersequenz von 5' - 3'
BK	For	GAC GCC TCT TCA TGG TC
BK	Rev	TAG GAG CCC CCG TAT TTC TT
HPRT	For	CAT TAT GCC GAG GAT TTG GA
HPRT	Rev	CCT TCA TGA CAT CTC GAG CA
Slack	For	CTG CTG TGC CTG GTC TTC A
Slack	Rev	AAG GAG GTC AGC AGG TTC AA
Slick	For	CGC TGC GAA GTG GAT AGA AC
Slick	Rev	TGG GGC AAA ATC TTT CAC AG

### 2.10.3 RNA-Gewinnung aus Kardiomyozyten und Fibroblasten

Die RNA-Gewinnung aus murinen Kardiomyozyten und Fibroblasten wird mit dem NucleoSpin® RNA Kit der Firma Macherey-Nagel und gemäß den Angaben des Herstellers (*NucleoSpin® RNA protocols*) durchgeführt. Die Zellen werden direkt nach der Isolation (siehe 2.5.3) für die RNA-Analytik weiter prozessiert. In einem ersten Schritt wird das isolierte Zellpellet mit 350 µl Lysepuffer (RA 1), versetzt mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol, durch starkes Vortexen lysiert. Durch das Vorhandensein chaotroper Substanzen werden vorliegende RNAsen inaktiviert. Um die Viskosität des Lysats herabzusetzen, wird dieses für 1 min bei relativer Zentrifugalkraft (*relative centrifugal force*, rcf) von 11.000 x g über einen violett gefärbten NucleoSpin®Filter zentrifugiert. Der Durchlauf wird nach der Zentrifugation mit 350 µl Ethanol (70 % V/V) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vermengt. Diese Maßnahme verbessert die Bindungseigenschaften der RNA und fungiert vorbereitend für den nun nachfolgenden Schritt, bei dem die RNA an eine NucleoSpin®RNA Säule gebunden wird. Das Ethanol-verdünnte Lysat wird auf die blaue NucleoSpin®RNA Säule aufgetragen und erneut für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die RNA-bindende Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt. Um die Silikamembran zu entsalzen, wird nun ein MDB (*membrane desalting buffer*)-Puffer aufgetragen. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 11.000 x g für 1 min. Die Entsalzung steigert die Effektivität des rDNase-Verdauens. Pro Säule werden 100 µl einer Verdauungslösung vorbereitet, die sich aus 10 µl rDNase und 90 µl rDNase-Reaktionspuffer zusammensetzt. Für eine exakte Dosierung werden davon nun 95 µl der Mischung tropfenweise auf die Silikamembran pipettiert und bei RT für 15 min inkubiert. In dieser Inkubationszeit wird die gebundene DNA vollständig verdaut. Gestoppt wird dieser Prozess durch die Zugabe von 200 µl rDNase-inaktivierendem Puffer RAW2. Erneut folgt eine Zentrifugation für 30 s bei 11.000 x g. Anschließend wird die Säule zwei Mal mit 600 µl RA3-Puffer für 30 s bei 11.000 x g gereinigt. Im letzten Waschschrift wird ein reduziertes Volumen von 250 µl RA3-Puffer verwendet und die Säule bei gleichbleibender relativer Zentrifugalkraft für 2 min gereinigt. In einem finalen Extraktionsschritt wird nun die gereinigte RNA eluiert. Die Säule wird auf ein 1,5 ml Auffanggefäß transferiert, mit 60 µl DEPC-H<sub>2</sub>O beladen und ein letztes Mal für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten RNA wird mittels Nanophotometer gemessen und liegt i.d.R. bei isolierten Zellen unter 0,1 µg/µl. Bis zur weiteren Prozessierung werden die RNA-Proben bei -20°C gelagert.

### 2.10.4 RNA-Isolation aus murinem Herzgewebe

Die RNA-Isolation aus dem murinen Herzgewebe erfolgt mit dem Reagenz peqGold RNAPure der Firma peqlab. Die Inhaltsstoffe Phenol und Guanidinisothiocyanat steuern eine präzise Zellyse und inaktivieren RNAsen sowie weitere Enzyme. Das bei -80°C gelagerte Herz (siehe 2.5.4) wird zunächst mit einer adäquaten Menge (1 ml/100 mg Gewebe) versetzt und mithilfe des Handdispersierers homogenisiert. Anschließend werden 0,2 Volumenanteile an Chlorophorm zupipettiert und für ca. 30 s gevortext. Nach einer kurzen Inkubationsphase von 5 min auf Eis wird die Gewebesuspension für weitere 5 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen, wobei die obere, wässrige Phase die extrahierten

Nukleinsäuren enthält. Diese wird also vorsichtig abgenommen und in ein frisches Auffanggefäß überführt. In Abhängigkeit des transferierten Volumens werden nun 0,7 Volumenteile Isopropanol zugegeben und die RNA über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gefällt. Am Folgetag nach der RNA-Fällung werden die Proben für 10 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Um das RNA-Pellet zu waschen, wird der Überstand abgenommen, 800 µl Ethanol (75 % V/V) zugegeben und erneut für 10 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird wiederholt verworfen und das RNA-Pellet für 10 - 15 min bei RT getrocknet. Nach vollständiger Trocknung werden 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O pro Reaktionsgefäß zugegeben und das Pellet bei 56°C und regelmäßigem Vortexen innerhalb von 10 min gelöst. Zur Entfernung von genomischer DNA als möglicher Störfaktor für die spätere qRT-PCR folgt ein zusätzlicher DNase-Verdau. Der Verdau-Ansatz setzt sich zusammen aus 20 µl RNA-Lösung, 2,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 2 µl DNase I. Die Degradierung der DNA erfolgt in zwei Schritten: Beginnend mit einer Inkubationsphase von 30 min bei 37°C wird der Ansatz für weitere 5 min auf 80°C erhitzt, das primär der Inaktivierung der DNase selbst dient. Zur Erfassung der vorliegenden RNA-Konzentration folgt zuletzt die Messung am Nanophotometer. Hier wurde auch das Nukleinsäure/Protein-Verhältnis ( $A_{260}/A_{280}$ ) bestimmt. Ein Wert von > 1,8 impliziert eine reine Probe ohne Proteinverunreinigung. Anders als bei den kardialen Zellproben liegt die RNA-Konzentration von Herzgewebe i.d.R. über 0,1 µg/µl und wird entsprechend auf diese Zielkonzentration eingestellt. Eine Lagerung der RNA-Proben findet bei -20°C statt.

### 2.10.5 cDNA-Synthese

Zur Erzeugung einer einsträngigen, komplementären DNA (cDNA) aus den vorliegenden RNA-Proben kommt das iScript cDNA-Synthese Kit von BioRad zum Einsatz. Entscheidend für die Informationsrückführung von mRNA zu cDNA ist das Enzym reverse Transkriptase (rT). Für die Umschreibung wird ein Pipettieransatz vorbereitet, der sich zusammensetzt aus 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 4 µl 5x iScript-Mix, 5 µl RNA-Probe und 1 µl rT. Zur Vereinfachung des Pipettiervorgangs wird ein Mastermix aus DEPC-H<sub>2</sub>O, iScript-Mix und rT für die Anzahl an Proben vorbereitet und jeweils 15 µl in auf Eis gelagerte 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend werden die Volumina der RNA-Proben hinzugefügt. Für jede Probe wird zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, um mögliche Fehler beim DNase-Verdau sicher auszuschließen. Der Probenansatz der Negativkontrolle gestaltet sich identisch mit Ausnahme der rT, die konsequenterweise nicht zugefügt wird. Die cDNA-Synthese findet nun im PCR-Thermocycler bei in Tabelle 2.3 dargestelltem Temperaturprogramm statt. Nach erfolgter Umschreibung der mRNA werden die cDNA-Proben mit 180 µl DEPC-H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10 verdünnt auf eine Endkonzentration ≤ 0,01 µg/µl. Erneut werden die Proben bis zur Durchführung der qRT-PCR bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.3 Temperaturprotokoll der cDNA

<b>Temperaturprogramm: cDNA-Synthese</b>			
T1	Primeranlagerung	25,0°C	5 min
T2	Reverse Transkription	42,0°C	30 min
T3	Inaktivierung der Reversen Transkriptase	85,0°C	5 min
T4	Kühlung (Hold)	4,0°C	24 h

### 2.10.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) ist ein labortechnisches Verfahren zur Erfassung der mRNA-Expression (vorliegend als cDNA), basierend auf einer Fluoreszenz-gemessenen Quantifizierung. Zum Einsatz kommen Fluoreszenzfarbstoffe, die an doppelsträngige DNA als Amplifikationsprodukt binden und deren Signalintensität mit der Menge an PCR-Produkt korreliert (Heid et al. 1996). Die verwendeten Primer weisen folgende Eigenschaften auf: Primerlänge  $\leq 23$  bp, Schmelztemperatur  $58^{\circ}\text{C} - 64^{\circ}\text{C}$  und Fragmentgröße 70 bp-120 bp. Die Oligonukleotid-Lyophilisate werden mit DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingestellt. Für die qRT-PCR werden sie in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt, d. h. es erfolgt eine zweite 1:50 Verdünnung (4  $\mu\text{l}$  Primer-Stammlösung und 196  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O) kurz vor der Anwendung. Der Reaktionsansatz basiert auf der Verwendung des SsoAdvanced Universal SYBR<sup>®</sup>Green Supermix, der den Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>Green beinhaltet. Neben diesem enthält der Reaktionsmix die zusätzlichen Bestandteile dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, passive Referenzfarbstoffe, Puffer und Stabilisatoren sowie die *antibody-mediated hot-start Taq* bzw. *Sso7d Fusion* Polymerase. Insgesamt setzt sich der Reaktionsansatz aus 7,5  $\mu\text{l}$  SsoAdvanced Universal SYBR<sup>®</sup>Green Supermix, je 2,25  $\mu\text{l}$  des Primerpaars und 3  $\mu\text{l}$  der Proben-cDNA (siehe 2.10.5) zusammen. Um auch bei diesem Protokoll den Arbeitsprozess effizient zu gestalten, wird ein Mastermix aller Komponenten (mit Ausnahme der cDNA) vorbereitet. Für jede Probe werden technische Triplikate (+rT-cDNA) und eine Negativkontrolle (-rT-cDNA) aufgetragen. Die 96-Well PCR-Platte wird auf Eis gelagert, um ein Pipettieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  zu garantieren. Nachdem jeweils 12  $\mu\text{l}$  des Mastermixes vorgelegt sind, werden zuletzt je 3  $\mu\text{l}$  der Ziel-cDNA hinzugefügt und die Platte mit einer Versiegelungsfolie Microseal<sup>®</sup>B' verschlossen. Die qRT-PCR wird an einem Real-Time PCR-Cycler unter Verwendung des in Tabelle 2.4 dargestellten Temperaturprogramms durchgeführt.

Tabelle 2.4 Temperaturprotokoll der qRT-PCR

<b>Temperaturprogramm: cDNA-Amplifikation</b>			
T1	Aktivierung der DNA-Polymerase	95,0°C	2 min
T2	Denaturierungsphase	95,0°C	5 s
T3	Hybridisierungs- und Elongationsphase	58,0°C	20 s
T4	Fluoreszenzmessung		
Wiederholung Zyklus T2 - T4:			40x
T5	Schmelzkurve 58,0°C - 95,0°C (0,5°C Intervalle)		5 s

T1 dient dem Erhitzen der Probe und dem Aktivieren der DNA-Polymerase. Die Zyklen T2 - T4 wiederholen sich 40x zur Amplifikation der cDNA und quantitativen Fluoreszenzmessung. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>Green bindet dabei an die generierten DNA-Doppelstränge, das die Verstärkung des Fluoreszenzsignals um ein 1000-faches erhöht. Die Schmelzkurve zum Ende der Messung spiegelt die Fragmentlänge des gebildeten PCR-Produkts wider und gibt Auskunft über die Spezifität. In Abhängigkeit der Basenzusammensetzung und der Länge weist die dsDNA als PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur auf, bei der eine Denaturierung des Doppelstrangs und somit eine Fluoreszenzfarbstoff-Freisetzung stattfindet.

Letztlich sollte die Schmelzkurvenanalyse einen uniformen Kurvenverlauf mit Einzelpeaks aufweisen, um die Abwesenheit unspezifischer PCR-Produkte zu bestätigen.

Entscheidend für die Auswertung der qRT-PCR ist der  $C_t$ -Wert (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus), der den Zeitpunkt definiert, an dem das Fluoreszenzsignal des Amplifikationsprodukts über dem Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz liegt. Für jedes Zielgen wird der individuelle  $C_t$ -Wert, gemittelt aus den drei technischen Replikaten, berechnet und in Relation zu einem Referenzgen (*housekeeping gene*) wie z. B. HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) gesetzt. Dies gelingt durch die Berechnung des  $\Delta C_t$ -Werts als Differenzwert der Subtrahenden  $C_t$ -Wert<sub>(Referenzgen)</sub> und  $C_t$ -Wert<sub>(Zielgen)</sub>. Der Annahme folgend, dass sich pro Zyklus die cDNA-Menge verdoppelt, wird das relative mRNA-Expressionslevel des Zielgens durch eine zusätzliche Zweierpotenz wie folgt berechnet:

$$\text{relative mRNA} - \text{Expression} = 2^{(C_t\text{-Wert}_{\text{Referenzgen}} - C_t\text{-Wert}_{\text{Zielgen}})}$$

#### Formel 2.4 Berechnung der relativen mRNA-Expression nach Durchführung der qRT-PCR

Das relative mRNA-Expressionslevel eines Amplifikats beruht auf der Erfassung des  $C_t$ -Werts (*cycle threshold*), der Bezugnahme auf ein Referenzgen und Berücksichtigung der cDNA-Zunahme.

## 2.11 Proteinanalytik

### 2.11.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Coomassie-Brilliant-BlueG 250	3862.2	Carl Roth
cOmplete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail	11836170001	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
Essigsäure (100 %)	3738.5	Carl Roth
Ethanol	34963	Sigma-Aldrich
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol (absolut)	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	K305	Carl Roth
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	3957.2	Carl Roth
Natrium-Deoxycholat	3484.1	Carl Roth
Nonidet-P40	74385	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	6367.2	Carl Roth
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I	P0044	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	P5726-	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (84,5 %)	6366.1	Carl Roth
Proteinmarker IV	27-2110	PeqLab
PVDF-Membran (Immobilon®-FL Transfer Membran)	IPFL00010	Merck Millipore
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Rotilabo® Blottingpapiere (Dicke: 0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:5) (Acrylamid)	3029.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	263.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Tween 20	9127.1	Carl Roth
ε-Aminocaprinsäure	A2504	Sigma-Aldrich

## 2.11.2 Puffer und Lösungen

### Herstellung von Proteinlysaten und Proteinkonzentrationsbestimmung

#### Bradford-Lösung

Coomassie-Brilliant-BlueG250	200 mg
Ethanol	100 ml
Phosphorsäure	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

Lichtgeschützte Lagerung bei 4°C

#### 200 mM PMSF

PMSF	348,4 mg
Ethanol (100 %)	10 ml

Lagerung bei -20°C

#### 5 % Natrium-Deoxycholat-Lösung

Natrium-Deoxycholat	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Lichtgeschützte Lagerung bei RT

#### 10 % Nonidet-P40 Lösung

Nonidet P40	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### SDS-Lysepuffer

dH <sub>2</sub> O	1,79 ml
10 % SDS	134 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,3	42 µl
β-Mercaptoethanol	34 µl
PMSF (200 mM)	4 µl

Frische Herstellung und Lagerung bei 4°C

#### 1 M Dithiothreitol (DTT)-Lösung

DTT	15,425 g
dH <sub>2</sub> O	

Lagerung bei -20°C

#### 4x Laemmli

SDS	5,0 g
TRIS	2,4 g
Bromphenolblau	4,0 mg
Glycerin	40 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

pH-Einstellung auf 6,7 mit HCl

#### 1 M Tris-HCl, pH 8,3

Tris	121,1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

pH-Einstellung auf 8,3 mit HCl

#### Protease-Inhibitor Stock (10x)

cOmplete Mini Cocktail	1 Tbl.
dH <sub>2</sub> O	1 ml

Lagerung bei -20°C

#### RIPA-Puffer

dH <sub>2</sub> O	607,5 µl
5 % Natrium-Deoxycholat-Lsg.	100 µl
10 % Nonidet-P40 Lösung	100 µl
Protease-Inhibitor Stock (10 %)	100 µl
4 M NaCl-Lösung	37,5 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,3	25 µl
Phosphatase-Inhibitor Cocktail I	10 µl
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	10 µl

Frische Herstellung und Lagerung bei 4°C

#### Probenpuffer

4x Laemmli	500 µl
1M DTT	5 µl

Lagerung bei -20°C

**10 % SDS**

SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**4 M NaCl-Lösung**

NaCl	23,4 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot**

**1,8 M Tris-HCl, pH 8,8**

Tris	218 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 8,8 mit HCl

**0,6 M Tris-HCl, pH 6,8**

Tris	72,7 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 6,8 mit HCl

**30 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)**

APS	15 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Lagerung bei -20°C

**500 mM Tris**

Tris	30 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

**10x Elphor-Puffer**

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 8,3 mit HCl

1x Elphor-Puffer: 1:10 Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O

**7,5 % Trenngel (2 Mini-Gele)**

dH <sub>2</sub> O	4,25 ml
Rotiphorese Acrylamid-Lsg.	2,15 ml
1,8 M Tris-HCl, pH 8,8	1,8 ml
10 % SDS	83,5 µl
30 % APS	33,3 µl
TEMED	10 µl

**5 % Sammelgel (2 Mini-Gele)**

dH <sub>2</sub> O	3,6 ml
Rotiphorese Acrylamid-Lsg.	0,83 ml
0,6 M Tris-HCl, pH 6,8	0,5 ml
10 % SDS	50 µl
30 % APS	16,6 µl
TEMED	10 µl

**12,5 % Trenngel (2 Mini-Gele)**

dH <sub>2</sub> O	3,15 ml
Rotiphorese Acrylamid-Lsg.	3,55 ml
1,8 M Tris-HCl, pH 8,8	1,8 ml
10 % SDS	83,5 µl
30 % APS	33,3 µl
TEMED	10 µl

**2x Blotting Puffer**

500 mM Tris	96 ml
Glycin	2,9 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**Anoden-Puffer I**

Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 10,4

**Kathoden-Puffer**

Tris	3,0 g
ε-Aminocapronsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 7,6

**Anoden-Puffer II**

Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH-Einstellung auf 10,4

**10x TBST-Puffer**

NaCl	82,3 g
Tris	12,1 g
Tween 20	5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH-Einstellung auf 8,0	

1x TBST-Puffer: 1:10 Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O

**Blockierlösung**

Milchpulver	5 g
1x TBST	ad 100 ml

**Antikörper-Verdünnungslösung**

BSA	
NaN <sub>3</sub>	0,05 g
1x TBST-Puffer	ad 50 ml

**2.11.3 Antikörper für die Western Blot-Analyse****Primärantikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
Anti-Akt	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#9727)
Anti-Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#9271)
Anti-β-Aktin (8H10D10)	Maus	1:1000	Cell Signaling (#3700)
Anti-Calsequestrin	Kaninchen	1:5000	Thermo Scientific (#PA1-913)
Anti-GAPDH	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#2118)
Anti-HSP60	Kaninchen	1:200	Santa Cruz (#sc-13966)
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#9102)
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (#9101)
Anti-PKCε (E-5)	Maus	1:200	Santa-Cruz (#sc-1681)
Anti-Phospho-PKCε	Kaninchen	1:200	Santa Cruz (#sc-12355-R)
Anti-Slack/Slo2.2/KCNT1	Maus	1:600	NeuroMab clone N3/26

**Sekundärantikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
Anti-Mouse Cy 3 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare (#PA43009)
Anti-Rabbit Cy 5 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare (#PA45011)

**2.11.4 Protein-Gewinnung aus kardialen Zellen und Herzgewebe**

Für die Proteinextraktion von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten (siehe 2.5.3) wird das isolierte Zellpellet in Abhängigkeit des zu untersuchenden Proteins mit RIPA- oder SDS-Lysepuffer lysiert. Für den qualitativen Nachweis der Slack-Expression wurde der RIPA-Puffer eingesetzt. Quantitative Untersuchungen zur Proteinexpression potentiell regulierter Proteine und deren Phospho-Level wurden unter Verwendung des SDS-Lysepuffers durchgeführt.

Je nach Pelletgröße wird ein Puffervolumen von 200 - 500 µl RIPA-Puffer verwendet, der grundsätzlich am Tag der Gewinnung frisch hergestellt wird. Nach Pufferzugabe werden die Zellen resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf dem Rüttler inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C. Das Proteinlysate wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zelltrümmer-enthaltende Pellet verworfen.

Erfolgt die Proteingewinnung mit dem SDS-Lysepuffer, wird dieser ebenfalls frisch hergestellt und die Zellen mit einem Volumen von 200 - 500 µl versetzt. Die Zellen werden durch kontrolliertes Auf- und Abpipettieren lysiert. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine werden die Proben anschließend für 10 min bei 95°C inkubiert. Da diese Form der Zellyse Detergenz-bedingt ein harscheres Vorgehen als der Einsatz des RIPA-Puffers darstellt, liegt grundsätzlich eine klare Lösung ohne Pelletrückstand vor.

Die Protein-Gewinnung aus isolierten Herzen (siehe 2.5.4) wurde mit SDS-Lysepuffer durchgeführt. Ein Gesamtherz benötigt ein Lysevolumen von 750 µl - 1 ml frisch hergestelltem Puffer. Zur Homogenisierung des Gewebes wird ein Handdispersierer (POLYTRON PT1200 Hand Dispenser, Kinematica) unter kontinuierlicher Steigerung der Drehzahl eingesetzt. Danach wird die Suspension für 1 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der klare Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser wiederum wird ebenfalls zur Proteindenaturierung für 10 min bei 95°C auf dem Heizblock inkubiert. Nach kurzem Vortexen schließt ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm den Isolationsprozess des Gesamtherzens ab. Die jeweilige Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels Bradford-Lösung wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben. Gelagert werden die Proteinlysate grundsätzlich bei -80°C.

### **2.11.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Bradford-Methode eingesetzt, die auf der Wechselwirkung des Triphenylfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit den Proteinseitenketten beruht (Bradford 1976). Liegt die ungebundene, kationische Form des Farbstoffs vor, befindet sich das Absorptionsmaximum bei 470 nm. Dieses verschiebt sich durch die Ausbildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes auf ein Maximum von 595 nm. Die Verschiebung wird photometrisch erfasst durch die Bezugnahme auf eine proteinfreie Kontrolle, die ausschließlich das Farbreagenz enthält. Um von der Absorptionsverschiebung auf die absolute Proteinkonzentration rückschließen zu können, wird das Photometer mit Standardproteinen beispielsweise einer BSA-Eichkurve kalibriert.

Die Messung des Absorptionsniveaus erfolgt in Einmalküvetten. Im Verhältnis 1:20 werden 5 µl Proteinlösung mit 95 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt. Um den verwendeten Lysepuffer zu berücksichtigen, wird für die Negativkontrolle ebenfalls eine 1:20 Verdünnung mit der reinen Pufferlösung durchgeführt. Anschließend werden die verdünnten 100 µl Proteinproben mit 900 µl Bradfordlösung (siehe 2.11.2) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml vervollständigt. Die Proben werden für 5 min im Dunklen inkubiert und anschließend am Photometer vermessen. Liegt die Konzentration oberhalb des messbaren Bereichs, ist eine 1:100 Verdünnung durchzuführen. Dies betrifft ausschließlich die Herzlysate-Proben.

### **2.11.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülmasse (Smith 1984). Im Rahmen der Probenvorbereitung (siehe 2.11.6.1) kommt es zur Denaturierung und negativen Beladung der Proteine, die linear ausgerichtet durch eine Polyacrylamidmatrix Richtung Anode wandern. Das verwendete

diskontinuierliches Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel (siehe 2.11.6.2). Je nach Zusammensetzung des Trenngels kann der molekulare Siebeffekt moduliert und somit der Fokus auf die Auftrennung von Proteinen kleinerer oder größerer Molekülmasse gelegt werden.

### **2.11.6.1 Probenvorbereitung**

Die isolierten Proteinproben werden für die Durchführung der SDS-PAGE auf eine Zielkonzentration von 80 µg pro 20 µl Taschenvolumen, d. h. 4 µg/µl eingestellt, indem sie mit dH<sub>2</sub>O und Probenpuffer (siehe 2.11.2) versetzt werden. Sind die Proteinlysate bei -80°C gelagert, werden sie vor der Konzentrationseinstellung für 5 min bei 95°C und 300 rpm aufgetaut, gevortext und abzentrifugiert. Dies dient der vollständigen Denaturierung der Proteinstruktur. Nun wird ein definierter Probenanteil entnommen, mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 5 µl 4xLaemmli/DTT pro Ansatz versetzt. Das anionische Detergens SDS fungiert ebenfalls zur Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstruktur und maskiert zudem die Eigenladung der Proteine. Durch die Bindung eines SDS-Moleküls an je zwei Aminosäuren erhält das Protein eine kontinuierliche negative Ladungsverteilung, die proportional zur Gesamtmasse ist. Außerdem werden die negativ geladenen Proteine gegenseitig abgestoßen, was wiederum die lineare Ausrichtung im Gel unterstützt. Vor der Beladung des Acrylamidgels werden die Proben kurz für 5 min bei 95°C und 300 rpm inkubiert.

### **2.11.6.2 Herstellung des Acrylamidgels und Durchführung der SDS-PAGE**

Das verwendete Polyacrylamidgel setzt sich zusammen aus einem Sammelgel zur Anordnung der aufzutrennenden Proteine und einem Trenngel (siehe 2.11.2). Die Herstellung des diskontinuierlichen Gels gelingt durch die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid, initiiert durch den Radikalstarter APS und den Katalysator TEMED: Die Porengröße des Gels wird durch den Anteil der beiden Polymerisate definiert. Beispielsweise wird zur Auftrennung großmolekularer Proteine wie Ionenkanäle ein geringprozentiges Trenngel (7,5 %) mit kleinerem Acrylamid-Anteil und somit größerer Porengröße gewählt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung erzeugt das SDS-haltige TRIS-Glycin-Puffersystem aufgrund der vorliegenden Elektrolyte ein elektrisches Feld, welches die Migration der denaturierten, negativ geladenen Proteine bewirkt (Laemmli 1970).

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wird eine Gelgießapparatur der Firma Bio-Rad verwendet. Die einzelnen Komponenten (siehe 2.11.2) werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint. TEMED und APS, die eine rasche radikalische Polymerisation bewirken, werden zuletzt hinzugefügt. Umgehend wird die Lösung mit einer Stripette homogenisiert, aufgezogen und zwischen die eingespannten Glasplatten gegossen. Es wird zuerst das Trenngel vorgelegt und mit reinem Isopropanol überschichtet, damit eine geradlinige und blasenfreie Gelkante entsteht. Außerdem schützt die Alkoholschicht die Wechselwirkung der Radikale mit den Sauerstoffmolekülen in der Umgebungsluft. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert ist, wird nach frühestens 1 h das Isopropanol mithilfe von saugfähigem Filterpapier abgezogen. In identischer Vorgehensweise wird das Sammelgel aufgegossen und ein Probenkamm gesteckt. Die Polyacrylamidgele können am Vortag der

SDS-PAGE vorbereitet und bei 4°C über Nacht gelagert werden. Hierfür werden sie sorgfältig in feuchte Tücher gepackt und luftdicht verschlossen.

Kommen die Gele zum Einsatz, werden die Probenkämme unter fließendem VE-Wasser von den Glasplatten entfernt. Es werden jeweils zwei gegossene Gel-Glasplatten-Module in das zugehörige System der Elektrophoresekammer eingespannt. Die dabei entstehende Kammer wird mit dem Elektrophoresepuffer 1x Elphor (siehe 2.11.2) bis oberhalb der kleineren inneren Glasplatte befüllt. Ebenso wird das äußere Kammersystem der Apparatur bis zur Markierung mit 1x Elphor befüllt. Der Elektroden-verbindende Draht muss dabei vollständig vom Puffer bedeckt sein. Nun werden die vorliegenden Taschen mithilfe einer Hamilton-Spritze mit jeweils 20 µl Probenlösung beladen. Wie unter 2.11.6.1 beschrieben, wird pro Tasche 80 µg Protein vorgelegt. Für die Zuordnung der kDa-Größe werden 3 µl eines Proteinmarkers in die erste Tasche des Gels pipettiert. Probenfreie Taschen werden ebenfalls mit 10 µl 1x Laemmli beladen, damit eine gleichmäßige Lauffront der Proteine gesichert ist. Befinden sich die Proben im Sammelgel, wird eine Spannung von 80 V angelegt. Nach ca. 15 min wird diese für die Zeit im Trenngel auf 120 V erhöht. Je nach Zusammensetzung des Trenngels variiert die Gesamtdauer der SDS-PAGE. Der Grad der Proteinauftrennung und Positionierung im Gel sind an den farblich markierten Proteinen im Marker und der blau gefärbten Lauffront der Proben erkennbar.

### **2.11.7 Semi-Dry Western Blot-Methode**

Die Western Blot Methode dient dem Transfer aufgetrennter Proteine (Towbin et al. 1979) nach erfolgter Gelelektrophorese (siehe 2.11.6) auf eine Trägermembran und ermöglicht die Detektion eines Zielproteins (siehe 2.11.8). Für diese Arbeit wird das *semi-dry electroblotting* Verfahren angewendet. Mithilfe eines elektrischen Felds werden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran in horizontaler Ausrichtung übertragen. Für die Durchführung der *Semi-Dry* Western Blot Methode werden vorbereitend die Elektrodenplatten mit dH<sub>2</sub>O befeuchtet. Außerdem werden die Filterpapiere exakt auf die Größe der PVDF-Membran zugeschnitten. Die Pufferlösungen (siehe 2.11.2) werden entsprechend ihrer Anwendung angeordnet und die Filterpapiere darin getränkt. Pro Gel werden nun auf die befeuchtete Anodenplatte zuerst drei Filterpapiere, getränkt in Anoden-Puffer I und zwei weitere Filterpapiere, getränkt in Anoden-Puffer II, gestapelt. Anschließend werden zuerst die PVDF-Membran und dann das Protein-enthaltende Gel auf den Papierstapel platziert. Vorab wird die Trägermembran in Methanol aktiviert und kurz vor dem Auflegen mit Anoden-Puffer II benetzt. Außerdem wird das Sammelgel mittels Gelschieber unter fließendem VE-Wasser entfernt und nur das Trenngel für das Blotting-Verfahren verwendet. Um die Gel-Membran-Einheit mit Pufferlösung zu ummanteln, werden zuletzt fünf weitere Filterpapiere aufgelegt, die mit Kathoden-Puffer (siehe 2.11.2) durchtränkt sind. Die bereits gewässerte Kathodenplatte wird ebenfalls mit Kathoden-Puffer benetzt, auf den Blotting-Stapel aufgelegt und beschwert. Nach zügigem Anschließen der Netzteile wird eine Stromstärke von 60 mA pro Gel angelegt und nach 1h für weitere 15 min auf 90 mA erhöht.

### 2.11.8 Proteindetektion

Zum Nachweis der Proteinexpression wird die mittels *semi-dry electroblotting* erhaltende Membran in Antikörperlösungen (siehe 2.11.3) inkubiert. Nach dem Proteintransfer wird die Membran zuerst in 5 % Milchpulver-Lösung (siehe 2.11.2) für 1 h blockiert, um unspezifische Bindungsstellen an der Membranoberfläche abzusättigen. Danach wird die Membran in drei Waschschritten à 10 min mit 1xTBST-Lösung gereinigt. Mithilfe eines Skalpells und orientierend am Marker wird die Membran in Streifen zugeschnitten. In Abhängigkeit des Molekulargewichts des Zielproteins wird der zugehörige Membranstreifen in ein 50 ml Falcon eingedreht, welches die Primärantikörperlösung in der entsprechenden Verdünnung (siehe 2.11.3) beinhaltet. Diese wird mit einer Antikörper-Stammlösung frisch hergestellt und nur kurze Zeit bei 4°C gelagert. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C und ständiger Rotation des Falcons werden die Membranstreifen am Folgetag erneut 3x für je 10 min in 1xTBST gewaschen. Dadurch werden unspezifische Bindungen bzw. nicht gebundener Primärantikörper entfernt und nur die spezifische Bindung an den Epitopen des Zielproteins bleiben erhalten. Es folgt eine zweite Inkubation bei RT für 1 h in einer Sekundärantikörperlösung, hergestellt in einer Verdünnung 1:2500 mit 1xTBST. Diese Antikörper sind Fluorophor-gebunden, ermöglichen eine Fluoreszenz-basierte Proteindetektion und erfordern eine lichtgeschützte Inkubation. Die dafür verwendeten 50 ml Falcons werden entsprechend mit Alufolie ummantelt und auf einen Rotator platziert. In dieser Zeit bindet der Sekundärantikörper an das F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers, vorausgesetzt dieser ist über das Zielprotein als Antigen auf der Membranoberfläche verankert. Erneut wird die Membran in fünf Waschschritten à 5 min mit 1xTBST im Dunkeln von nicht-gebundener Sekundärantikörperlösung befreit. Die Trocknung der Membran erfolgt lichtgeschützt und in fusselfreien Präzisionswischtüchern eingebettet. Die Proteindetektion findet mit dem Amersham Imager 600 statt. Die Quantifizierung der Proteinbanden wird mit der Image QuantTL Software durchgeführt. Quantitative Angaben der Expressionslevel beziehen sich auf ein Referenzprotein wie  $\beta$ -Aktin oder HSP-60. Bei diesen Proteinen wird vorausgesetzt, dass deren Expression weder vom Genotyp noch von der Behandlung der Tiere reguliert wird.

## 2.12 Histologische Untersuchungen

### 2.12.1 Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Hersteller
Aceton	9372.4	Carl Roth
Bouin-Lösung	HT101128	Sigma-Aldrich
Deckgläser High Precision (20 x 60 mm)	LH26.1	Carl Roth
DePeX Eindeckmedium	HX069485	VWR
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	14190094	life technologies
Essigsäure (100 %)	3738.5	Carl Roth
Ethanol (absolut)	32205	Sigma-Aldrich
Färbegestell	H552.1	Carl Roth

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Färbekasten mit Deckel	H554.1	Carl Roth
Färbekasten nach Coplin	H548.1	Carl Roth
Feste Pikrinsäure	239801	Sigma-Aldrich
Fettstift (Hydrophobic Barrier Pen)	H-4000	Vector Laboratories
Formaldehydlösung (35 %)	4980.1	Carl Roth
Gesättigte wässrige Pikrinsäure-Lösung	P6744	Sigma-Aldrich
Hoechst	33258	Sigma-Aldrich
Kryotomklingen	MX35	Thermo Scientific
NEG-50 Einbettmedium	6502	Thermo Scientific
Objektträger SuperFrost (26 x 76 mm)	1879.1	Carl Roth
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
PermaFluor	TA-030-FM	Thermo Scientific
Saccharose	4621.2	Carl Roth
Salzsäure-Maßlösung 1 N	K025.1	Carl Roth
Streckglas 39,5 mm	449990	Thermo Scientific
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Xylol	9713.3	Carl Roth
Ziegennormalserum (NGS)	S-1000	Vector Laboratories

## 2.12.2 Puffer und Lösungen

### Organpräparation zur Anfertigung von Kryoschnitten

#### 4 % PFA-Stammlösung

PFA	20 g
dH <sub>2</sub> O	500 ml

#### 5 % Saccharose-Lösung

Saccharose	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### 10 % Saccharose-Lösung

Saccharose	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### 20 % Saccharose-Lösung

Saccharose	20 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### Picro-Sirius-Rot-Färbung

#### Sirius-Rot-Lösung

Direct Red 80	250 mg
dH <sub>2</sub> O	25 ml
Gesättigte wässr. Pikrinsäure-Lsg.	225 ml
Feste Pikrinsäure	ca. 50 mg

Direct Red 80 lösen in dH<sub>2</sub>O  
 Flüssige Komponenten filtrieren und vereinen  
 Feste Pikrinsäure zugeben

#### 0,01 N Salzsäure (HCl)-Lösung

1N HCl Maßlösung	2 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml

#### Bouin-Lösung

Gesättigte wässr. Pikrinsäure-Lsg.	150 ml
35 % Formaldehydlösung	50 ml
100 % Essigsäure	10 ml

### Erstellung von Zellpräparaten

#### Eindeckelmedium

Hoechst	7,5 µl
PermaFluor	7,5 ml

#### 0,1 % Triton X-100 Lösung

Triton X-100	0,5 ml
PBS	500 ml

<b>10 % NGS-Lösung</b>		<b>1,5 % NGS-Lösung</b>	
NGS	200 µl	NGS	35 µl
PBS	ad 2 ml	PBS	ad 2 ml

### 2.12.3 Organpräparation und Anfertigung von Kryoschnitten

Die Isolation muriner Herzen erfolgt wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben mithilfe der Langendorff-Apparatur und retrograder Perfusion der Herzkranzgefäße. Ist das Organ ausreichend gespült, wird es in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, das mit 4 % PFA-Lösung zur Gewebefixierung befüllt ist. Bei 4°C gelagert werden die Herzen für 4 h unter ständigem Schütteln inkubiert. Um die PFA-Lösung vollständig zu entfernen, werden die Organe in drei Waschschritten à 20 min mit PBS gereinigt. Anschließend folgt eine einstündige Inkubation in einer 5 % Saccharose-Lösung. Nach einer h wird diese durch eine 10 % Saccharose-Lösung ersetzt, in der die Herzen über Nacht inkubiert werden. Am Folgetag findet ein weiterer Inkubationsschritt nun für 24 h in einer 20 % Saccharose-Lösung statt. Der Saccharosegradient dient dem sanften Entzug von Flüssigkeit unter Erhalt der ursprünglichen Gewebestruktur. Zuletzt werden die Herzen mittels NEG-50-Einbettmedium in einer geeigneten Trägerform, geformt aus Aluminiumfolie, eingebettet. Gelagert werden die Kryopräparate bei -80°C bis zur Anfertigung der Kryoschnitte.

Am Kryotom werden Ventrikelschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Vor dem Schneideprozess wird das Präparat für mindestens 20 min in der Vorrichtung gelagert. Während des Schneidens liegen sowohl Objekt- als auch die Messertemperatur bei knapp unter -20°C. Um den kardialen Fibroseanteil infolge des chronischen MI zu erfassen, werden 10 Areale berücksichtigt. Die zugehörigen Schnitte verteilen sich systematisch vom Apex aufsteigend zur Ligatur. Beginnend am Apex wird eine Strecke von 250 µm Gewebe getrimmt. Anschließend werden im ersten Areal insgesamt 10 Schnitte verteilt auf 5 Objektträger (je 2 Schnitte pro Sektion und Genotyp) aufgenommen. Dieses Vorgehen wiederholt sich in jedem Areal. Ebenso wird zwischen den 10 Sektionen stets 250 µm Herzgewebe getrimmt. Die Schnitte werden anschließend sorgfältig beschriftet und bei -20°C bis zur histologischen Analyse gelagert.

### 2.12.4 Picro-Sirius-Rot-Färbung zum Nachweis von Fibrose

Zur lichtmikroskopischen Visualisierung des kardialen Kollagenanteils in gesunden und I/R-behandelten Herzen wird die Picro-Sirius-Rot-Färbung verwendet (Puchtler et al. 1973). Die Färbung lässt Kollagenbündel in roter Farbe erscheinen, während die ventrikuläre Muskelmasse als gelber Hintergrund vorliegt. Die anisotropen Farbstoffmoleküle lagern sich parallel an die Kollagenmoleküle an und verstärken durch die geordnete Ausrichtung des Einfallwinkels die Doppelbrechung des Lichts. Bei einer irregulären Anordnung im gesunden Gewebe bleibt dieses Phänomen aus. Es entsteht ein visueller Kontrast zwischen gesundem und pathophysiologischem Herzgewebe (Lattouf et al. 2014).

Die Herzschnitte (siehe 2.12.3) werden 30 min vor Beginn der Färbung bei RT aufgetaut. Sind die Schnitte vollständig getrocknet, werden sie für 24 h in einer Färbekammer, gefüllt mit

Bouin-Lösung (siehe 2.12.2), inkubiert. In dieser Zeit wird das Gefäß luftdicht mit Parafilm verschlossen. Anschließend wird der Schlitten mit den Objektträgern in eine zweite Färbekammer überführt und für 1 h in einer Sirius-Rot-Lösung inkubiert. Diese Inkubationszeit wird genutzt, um den nachfolgenden Färbeprozess vorzubereiten, darunter die Herstellung der 0,01 N HCl-Lösung (siehe 2.12.2). Es werden 13 Färbekammern vorbereitet, sodass die Schnitte, im Schlitten auf Objektträgern vorliegend, von Kammer zu Kammer überführt werden können. Dieser Prozess beginnt zunächst mit zwei Waschschritten in 0,01 N HCl-Lösung für jeweils 2 min und einem weiteren Waschschriff in dH<sub>2</sub>O für weitere 2 min. Daraufhin werden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, beginnend mit einer 50 % V/V Ethanol-Lösung, fortführend mit einer 70 % V/V und 90 % V/V Ethanol-Lösung und einer jeweiligen Inkubationszeit von 6 min. Zuletzt erfolgt die Dehydratation in purem Alkohol für 6 min. Die Volumenverdrängung von Ethanol-Wasser-Gemischen ist zu berücksichtigen. Durch einen anschließenden 4-minütigen Inkubationsschritt in Xylol wird das Gewebe entwässert, was das luftdichte Eindeckeln der Schnitte unterstützt. Dies erfolgt mithilfe des Eindeckmediums DePex und dem Auflegen eines Deckglases. Luftblasen werden durch sanftes Andrücken entfernt. Unter dem Anzug werden die Objektträger getrocknet und können am Histologiescanner untersucht werden.

Erfasst wird der prozentuale Anteil rot-gefärbten Kollagens in den vorliegenden Herzschnitten. Pro Areal wird eine Herzscheibe berücksichtigt und die Fibrosierung des Gesamtherzens als Mittelwert aus allen 10 Arealen ermittelt. Die quantitative Auswertung erfolgt mithilfe der Software ImageJ.

### **2.12.5 Anfertigung von Zellenpräparaten für Fluoreszenz-basierte Analysen**

Im Zuge der Expressionsanalyse der Kaliumsensoren GEPII in Kardiomyozyten und HEK293 Zellen nach erfolgter viraler Transduktion (siehe 2.7.4) bzw. Transfektion (siehe 2.8.5) wurden immunhistologische Präparate, wie nachfolgend beschrieben, angefertigt.

Zunächst werden die Zellen unter Verwendung einer 4 % PFA-Lösung für 10 min bei RT auf den vorgelegten Glasplättchen (Ø 30 mm) fixiert. Im Anschluss werden die Präparate mit PBS in zwei Durchgängen gewaschen. Nun folgt die Permeabilisierung der Zellen unter Verwendung einer 0,1 % Triton X-100-Lösung (siehe 2.12.2). Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wird dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden unspezifische Bindungen durch Inkubation in 10 % NGS-Lösung für 1 h bei RT abgesättigt. Sind zusätzliche Strukturanalysen gewünscht, folgt der Einsatz von Antikörperlösungen. Primärantikörper-Lösungen werden über Nacht den Präparaten zugeführt und am Folgetag nach Waschen mit 1,5 % NGS-Lösung entfernt. Sekundärantikörper-Lösungen, gekoppelt an Fluorophore, folgen für eine 1-stündige Inkubationszeit. Wird nur die Expression der GEPII untersucht, entfällt der Einsatz zusätzlicher Antikörper-Lösungen. Die Zellen werden direkt mithilfe von 80 µl Eindeckmedium, bestehend aus PermaFluor und DNA-färbendem Hoechst, auf Objektträgern fixiert. Lichtgeschützt werden die Zellpräparate über Nacht getrocknet und am Folgetag am Fluoreszenzmikroskop, angeregt bei einer Wellenlänge von 380 nm (Hoechst) bzw. 505 nm (YFP), untersucht. Der in den Zellkern-interkalierende Farbstoff emittiert im Lichtspektrum von blau, die Sensorverteilung wird im gelben Emissionsspektrum sichtbar.

## 2.13 Statistik

Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Die Gaußsche Normalverteilung wird mittels Shapiro-Wilk Test oder Kolmogorov-Smirnov Test untersucht und bestätigt. Werden zwei Gruppen miteinander verglichen, die der Normalverteilung entsprechen, wird der zweiseitige Student-t-Test angewendet. Dies betrifft beispielsweise den Vergleich von Genotypen (WT vs. Slack KO und CM Slack CTR vs. CM Slack KO) oder von Behandlungsregimen (z. B. I/R-behandelte Gruppe vs. unbehandelte Gruppe). Werden mehr als zwei Wertegruppen verglichen, wird die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) ( $\alpha = 0,05$ ) eingesetzt. Auch hier ist die Gleichverteilung der Grundgesamtheit Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Tests. Im Anschluss daran wird als Post-hoc Test eine Bonferroni-Korrektur zur Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung durchgeführt. Bestätigt sich die Normalverteilung zweier Wertegruppen nicht, erfolgt die statistische Untersuchung mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney *U* Tests.

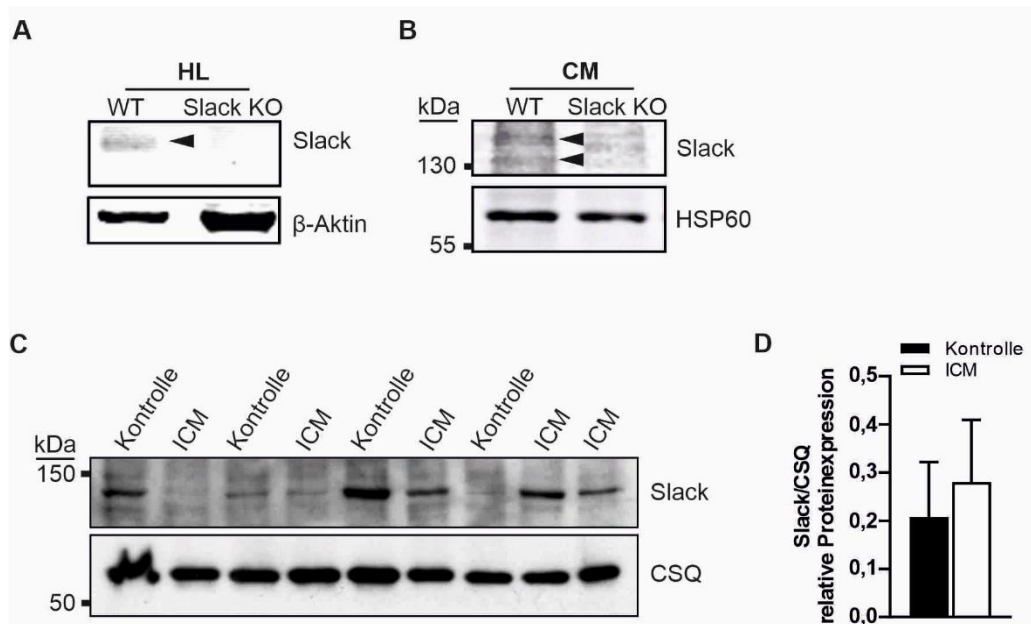
Für die statistische Analyse wird die Software GraphPad Prism 9 verwendet. P-Werte  $< 0,05$  werden als signifikant gekennzeichnet, hierbei gilt \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ . Werden statistische Vergleiche zu den jeweiligen Kontrollgruppen gezogen, werden diese als †  $p < 0,05$ , §  $p < 0,01$  und #  $p < 0,001$  hervorgehoben und entsprechend als statistisch signifikant unterschiedlich gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expressionsnachweis von Slack in murinen und humanen Herzen

Grundvoraussetzung für die Untersuchung der kardioprotektiven Funktion des Slack-Kanals im MI-Modell ist der Expressionsnachweis des Kanals im potentiell betroffenen Gewebe. Wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, wird die Expression und Funktionalität von Slack im Herzen aktuell noch kontrovers diskutiert. Auch deuten die bisherigen Transkriptionsanalysen (Schaum et al. 2018; Yuan et al. 2003) auf eine geringe Kanaldichte hin, was für den Nachweis des Slack-Proteins eine zusätzliche Herausforderung darstellen dürfte.

Ergänzend zu den früheren Befunden wurde die Expressionsanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von WT-Mäusen und Slack KO-Wurfgeschwistern (Lu et al. 2015), die als Negativkontrolle dienten, durchgeführt. In isoliertem WT-Gesamtherzlysats verlief der mittels rT-PCR durchgeführte qualitative Expressionsnachweis erfolgreich. Erwartungsgemäß blieben entsprechende Slack KO-Proben negativ (Abb. 3.1 A). Auf Proteinebene konnten diese Slack-Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen mittels Western Blot Analyse kardiomyozytärer Proben bestätigt werden. Unter Verwendung eines spezifischen Slack-Antikörpers, der an den zytoplasmatischen C-Terminus des Slack-Kanals bindet (Rizzi et al. 2016), war entsprechend ausschließlich in den WT-Herzmuskelzellproben eine Proteinbande bei ca. 140 kDa detektierbar (Abb. 3.1 B). In Kooperation mit Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Nadja Bork (Zentrum für Experimentelle Medizin, Arbeitsbereich Experimentelle Herz-Kreislaufforschung, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden zusätzliche Expressionsstudien an humanen ventrikulären Proben durchgeführt werden. Wie in Abb. 3.1 C dargestellt, stammte das Material von Patienten mit gesunden Herzen und unauffälliger linksventrikulärer Herzfunktion (Kontrolle) als auch von Patienten mit diagnostizierter ischämischer Kardiomyopathie (ICM). Die Patienten der ICM-Gruppe zeigten aufgrund einer atherosklerotischen Vorerkrankung der Herzen eine reduzierte Auswurf Funktion von < 35 - 40 % (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev). In den Ventrikelproben dieser Patienten war eine Proteinbande mit dem für Slack typischen Molekulargewicht von 140 kDa nachweisbar. Aufgrund des variablen Expressionsniveaus zwischen den zwei Patientengruppen konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollherzen und den Herzen mit ICM abzeichnen (Abb. 3.1 D).



**Abb. 3.1 Expressionsanalyse von Slack-Kanälen in murinem und humanem Herzgewebe bzw. Herzmuskelzellen**

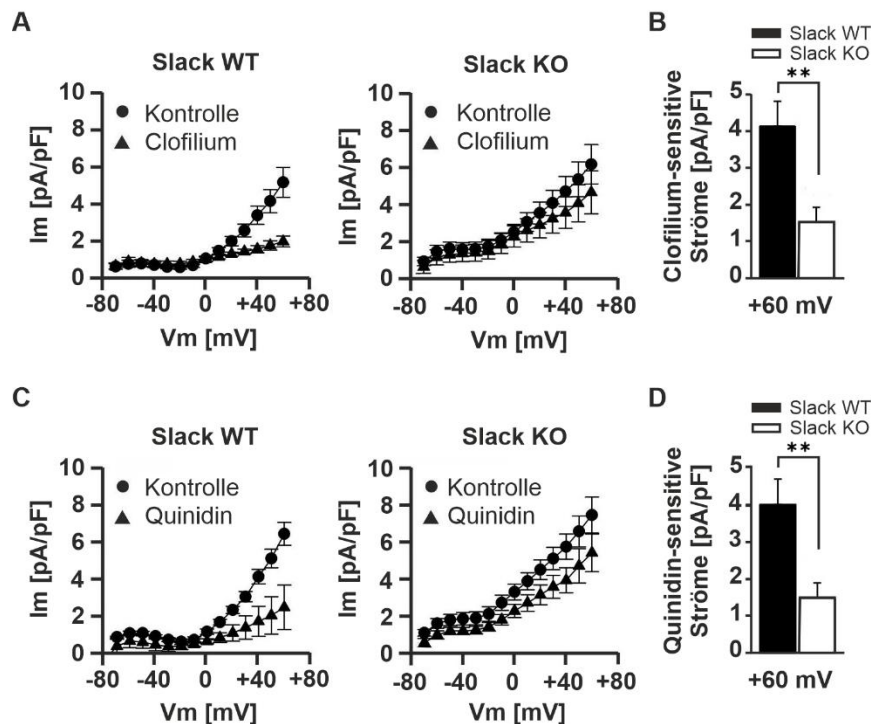
**(A)** Nachweis der Slack-mRNA in WT-Herzen mittels rT-PCR. Es zeigte sich kein Amplikon in den Slack KO-Herzen. Der mRNA-Nachweis des Slack-Kanals erfolgte durch Dr. Anne Bausch (Institut für Pharmazie, Universität Tübingen). **(B)** Nachweis der Slack-Proteinexpression via Western Blot Analyse. Eine Proteinbande wurde ausschließlich in isolierten Kardiomyozyten von WT-Mäusen detektiert. Der HSP60-Nachweis diente der Ladungskontrolle. **(C)** Nachweis der Slack-Proteinexpression in humanen ventrikulären Proben von gesunden (Kontrolle) und pathophysiologisch veränderten Herzen infolge einer ischämischen Kardiomyopathie (ICM). Calsequestrin (CSQ) dient als Ladungskontrolle. **(D)** Die Quantifizierung der Slack-Proteinexpression in gesunden (Kontrolle) und erkrankten (ICM) humanen Herzen zeigte aufgrund der interindividuellen Schwankungen keinen signifikanten Unterschied. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{Kontrolle}} = 4$  und  $n_{\text{ICM}} = 5$ . Die humanen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev und Dr. Nadja Bork, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, generiert.

## 3.2 Funktionale Analyse von Slack-Kanälen in murinen Kardiomyozyten

### 3.2.1 Elektrophysiologische Untersuchungen von $\text{Na}^+$ -sensitiven $\text{K}^+$ -Strömen in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten

Die funktionale Bedeutung des Slack-Kanals im Herzen wurde mittels elektrophysiologischer Experimente an isolierten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen untersucht. Die *Patch-Clamp*-Versuche in der *Whole-Cell*-Konfiguration erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Xiaobo Zhou (Medizinische Fakultät Mannheim (UMM), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Wie in Abb. 3.2 A und C dargestellt, wurden *Whole-Cell*-Strom-Spannungskurven vor und nach Zugabe der Antiarrhythmika und  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Inhibitoren Clofilium und Chinidin detektiert. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-50$  mV wurden Potentialschritte in  $10$  mV-Intervallen von  $-70$  mV bis  $+60$  mV evoziert. Durch Zugabe der Modulatoren Clofilium und Chinidin wurde, trotz der eher geringen kardialen Expressionslevel des Slack-Kanals (Abb. 3.1 B), nur in den WT-Zellen der Gesamt- $\text{K}^+$ -Auswärtsstrom signifikant stärker blockiert als in den Slack KO-Myozyten, die sich annähernd insensitiv für Clofilium und Chinidin zeigten (Abb. 3.2 B und D). Die in den Slack-defizienten Kardiomyozyten auf die  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Inhibitoren reagierende  $\text{K}^+$ -

Auswärtsstromkomponente ist mutmaßlich auf funktionale Slack-Kanäle in murinen Herzmuskelzellen (Abb. 6.1) zurückzuführen. Letztlich zeigen diese Versuche aber, dass ein Großteil des  $K_{Na}$ -Auswärtsstroms dem Slack-Kanal zuzuordnen ist, was in Übereinstimmung mit älteren Literaturquellen (siehe 1.4.4) die Funktionalität des Kanals in murinen Kardiomyozyten, unabhängig von seiner Expressionsdichte, bestätigt.



**Abb. 3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionalität des Slack-Kanals in murinen Kardiomyozyten**

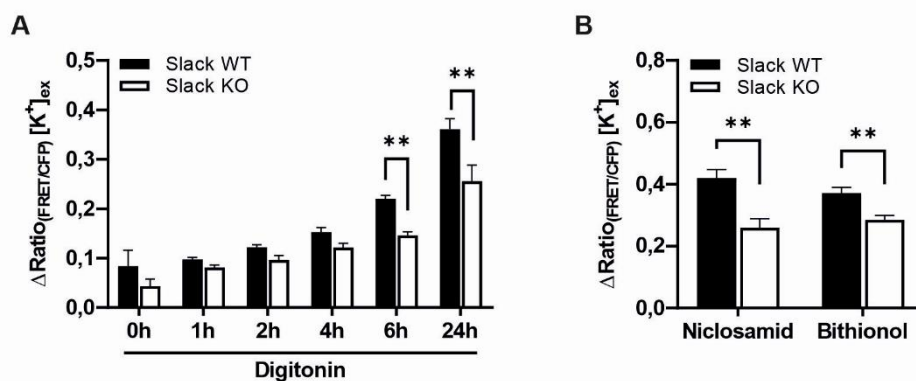
*Whole Cell* Strom-Spannungskurven gemessen in isolierten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen vor und nach Behandlung mit den  $K_{Na}$ -Inhibitoren Clofilium (A) und Chinidin (C). Die Aufnahmen erfolgten in einer HEPES-gepufferten Badlösung (in mM: NaCl 142; KCl 5,4;  $MgCl_2$  0,53;  $NaH_2PO_4$  0,33; Glucose 5,5; HEPES 5; pH7,4). Die Pipettenlösung beinhaltete die Ionenzusammensetzung (in mM):  $K^+$ -Aspartat 90;  $K_2$ -ATP 5; EGTA 5; NaCl 45; Tris-HCl 5; pH 7,4. Die Quantifizierung der Clofilium (B)- bzw. Chinidin (D)-sensitiven  $K^+$ -Auswärtsströme bei +60 mV zeigte einen signifikant erhöhten Anteil an Gesamt- $K^+$ -Auswärtsstrom in WT-Zellen im Vergleich zu den Slack KO-Kardiomyozyten. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{WT} = 8$  Kardiomyozyten (aus 3 Präparationen) und  $n_{Slack\ KO} = 9$  Kardiomyozyten (aus 3 Präparationen), \*\*  $p < 0,01$ . Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Xiaobo Zhou, Universität Heidelberg, generiert.

Zudem zeigte sich unter unstimulierten Kontrollbedingungen (bei 45 mM  $Na^+$  in der Patch-Pipette) ein tendenziell erhöhtes Strom-Spannungsverhältnis in den Slack KO-Zellen im Vergleich zu den Slack-positiven Kardiomyozyten (Abb. 3.2 A, C). Dies deutet auf eine veränderte (möglicherweise kompensatorische)  $K^+$ -Kanal-Komposition bzw.  $K^+$ -Kanal-Aktivität im Slack KO hin. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Beobachtung zu erklären.

### 3.2.2 FRET-basierte $[K^+]_{ex}$ -Untersuchungen in Kardiomyozyten

Eine weitere labortechnische Möglichkeit zur Untersuchung der Funktionalität des Slack-Kanals in isolierten Kardiomyozyten bietet der Einsatz von FRET-basierten  $K^+$ -Sensoren GEPIIs (Bischof et al. 2017) (siehe 2.9). Die extrazelluläre  $K^+$ -Dynamik wurde unter Verwendung des rekombinanten Sensors GEPII 1.0 in kardiomyozytären Zellsuspensionen von WT- und Slack KO-Mäusen analysiert. Vorab wurde die Funktionalität des Sensors mittels einer  $K^+$ -Verdünnungsreihe bestätigt und eine mittlere effektive  $K^+$ -Konzentration ( $EC_{50}$ ) von 0,67 mM bestimmt (Abb. 6.2).

Um einen  $K^+$ -Verlust der Zelle zu provozieren, wurden die isolierten WT- und Slack KO-Kardiomyozyten mit Digitonin, einem Plasmamembran-permeabilisierenden Detergens, behandelt. Die zunehmende Akkumulation von  $[K^+]_{ex}$  wurde über einen Zeitraum von 24 h für beide Genotypen beobachtet. Zu jedem Messzeitpunkt (0 bis 24 h) zeigte sich eine tendenziell geringere  $[K^+]_{ex}$  in den Slack KO-Zellsuspensionen (Abb. 3.3 A). Für die beiden zuletzt bestimmten Messwerte nach Digitonin-Exposition, d. h. bei 6 h (WT, 6 h:  $0,22 \pm 0,01$  vs. Slack KO, 6 h:  $0,14 \pm 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) und 24 h (WT, 24 h:  $0,36 \pm 0,02$  vs. Slack KO, 24 h:  $0,28 \pm 0,03$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) erreichten die Unterschiede zwischen den Genotypen das Signifikanzniveau mit entsprechend geringerem  $[K^+]_{ex}$  für den Slack KO.



**Abb. 3.3 FRET-basierte Untersuchungen zur Erfassung der  $[K^+]_{ex}$ -Dynamik von WT- und Slack KO-Kardiomyozyten**

FRET-basierte  $[K^+]_{ex}$ -Messungen im Überstand von isolierten WT- und Slack KO-Kardiomyozyten mittels rekombinantem  $K^+$ -Sensor GEPII 1.0. **(A)**  $\Delta$ FRET Ratio-Signale, gemessen nach Digitonin-Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h. Ein höheres Niveau an  $[K^+]_{ex}$  zeigte sich im Überstand von Slack WT-Proben. **(B)**  $\Delta$ FRET Ratio-Signale nach pharmakologischer Modulation der Slack-Kanal-Aktivität mit den Aktivatoren Niclosamid und Bithionol. Die Zunahme an  $[K^+]_{ex}$  war in den WT-Zellpools gegenüber den Slack KO-Proben signifikant erhöht. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit **(A)**  $n_{WT} = 4$  Isolationen,  $n_{Slack\ KO} = 5-7$  Isolationen und **(B)**  $n_{WT} = 5$  Isolationen,  $n_{Slack\ KO} = 6$  Isolationen, \*\*  $p < 0,01$ . Die Daten wurden zusammen mit Annika Luczak im Rahmen ihrer Masterarbeit generiert.

Im Folgenden wurde überprüft inwiefern die Anthelminthika und Slack-Aktivatoren Niclosamid und Bithionol  $[K^+]_{ex}$  Slack-abhängig in den Zellpools beeinflussen (Abb. 3.3 B). Es bestätigte sich eine verstärkte Akkumulation extrazellulärer  $K^+$ -Ionen in den WT-Proben gegenüber den Slack KO-Zellpools, die sich als das Resultat eines pharmakologisch-induzierten  $K^+$ -Auswärtsstroms via Slack deuten lässt (WT, Niclosamid:  $0,42 \pm 0,03$  vs. Slack KO, Niclosamid:  $0,26 \pm 0,03$ ; WT, Bithionol:  $0,37 \pm 0,02$  vs. Slack KO, Bithionol:  $0,28 \pm 0,03$ ).

$0,29 \pm 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Zusammengenommen implizieren die vorliegenden Daten, dass die Deletion des Slack-Kanals  $[K^+]_{ex}$  über einen Efflux von intrazellulären  $K^+$ -Ionen aus den Kardiomyozyten beeinflusst. Die FRET-basierten  $[K^+]_{ex}$ -Messungen können somit als indirekter Funktionsnachweis für Slack in Kardiomyozyten interpretiert werden.

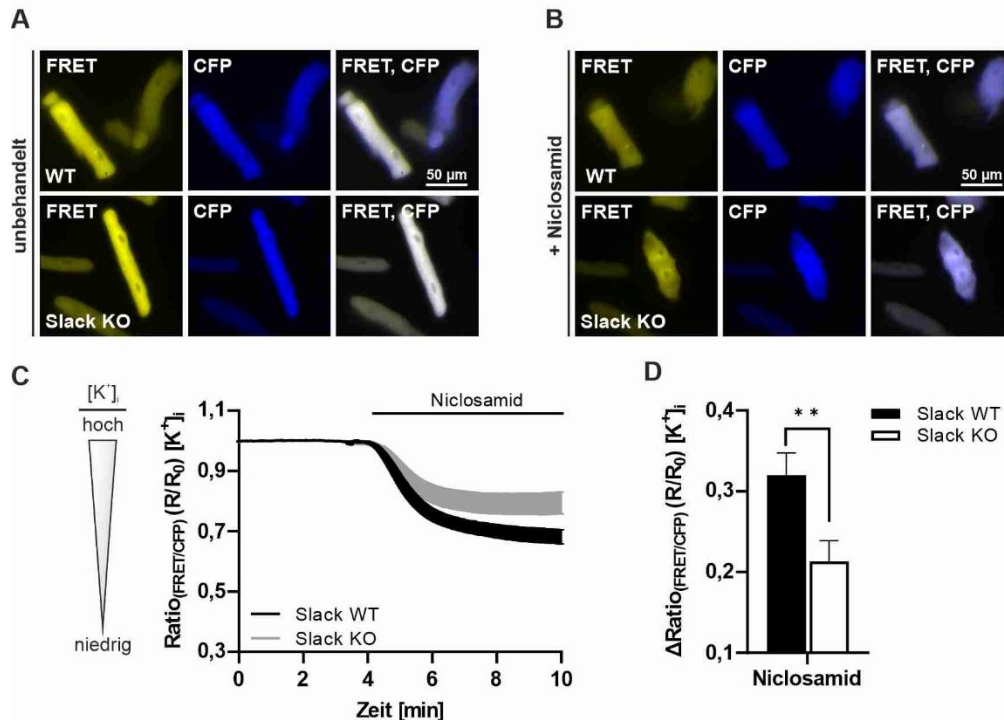
### 3.2.3 FRET-basierte $[K^+]_i$ -Untersuchungen in Kardiomyozyten

Nachdem sich in den FRET-basierten  $[K^+]_{ex}$ -Untersuchungen eine veränderte  $K^+$ -Dynamik in kardiomyozytären Slack KO-Proben abzeichnete (siehe 3.2.2), sollte konsequenterweise der  $[K^+]_i$ -Haushalt lebender Einzelzellen näher beleuchtet werden. Durch die Erfassung der  $[K^+]_i$ -Dynamik nach pharmakologischer Slack-Aktivierung sollte die funktionale Bedeutung des Kanals im Kardiomyozyt demonstriert werden. Die Messung des  $K^+$ -Gehalts in adulten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen erfolgte nach viraler Transduktion (siehe 2.7.4) und zytoplasmatischer Expression des Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0. Diese Sensorvariante zeigt durch den Einbau zusätzlicher Linker zwischen der BON- und der LysM-Domäne eine reduzierte  $K^+$ -Sensitivität ( $EC_{50}$ : 27,43 mM) und eignet sich daher deutlich besser für die Erfassung intrazellulärer  $K^+$ -Signale (Bischof et al. 2017), da  $[K^+]_i$  bei ca. 155 mM liegt.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde zunächst die Anreicherung des GEPIIs nach viraler Transduktion mittels AV5 im Kardiomyozyt überprüft (Abb. 3.4 A). Es bestätigte sich eine gleichmäßige Sensordistribution im Zytoplasma der stäbchenförmigen Myozyten und eine deutliche Aussparung der Zellkerne. Da primäre adulte Kardiomyozyten als ein ausgesprochen fragiler Zelltyp gelten, beschränkte sich die Messdauer auf ein Zeitfenster von 10 min. So konnte das Auftreten von Zelltod, ausgelöst durch Scherstress und Phototoxizität, auf einem geringen Niveau gehalten werden und Artefakte im Messbereich (durch aufschwimmende, tote Zellfragmente) weitestgehend vermieden werden. Um die Rolle des Slack-Kanals hinsichtlich der Regulation des  $[K^+]_i$ -Haushalts zu untersuchen, wurde dieser zusätzlich pharmakologisch adressiert. Nach einer *baseline*-Messung von 200 s wurden die WT- und Slack KO-Kardiomyozyten entsprechend mit dem Slack-Aktivator Niclosamid stimuliert (Abb. 3.4 C). Dies bewirkte eine augenscheinliche morphologische Längenveränderung der Kardiomyozyten unabhängig vom Genotyp (Abb. 3.4 B). Die Sarkomerlänge der WT-Kardiomyozyten verkürzte sich um einen prozentualen Wert von  $-28,81 \pm 6,17$  %. Bei den Slack KO-Kardiomyozyten lag eine Verkürzung von  $-35,57 \pm 6,18$  % vor. Dieses beobachtete Phänomen wurde als Slack-unabhängiger Effekt gedeutet. Zu den anthelmintischen Wirkungen von Niclosamid zählen beispielsweise das mitochondriale Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung und die negative Modulation der ATP-Produktion (Gao et al. 2018), was letztlich zur Schädigung der Herzmuskelzellen führt. Neben diesen Slack-unabhängigen morphologischen Effekten konnte bei der Betrachtung des FRET Ratio-Signals in Abb. 3.4 C eine deutliche Verminderung der Signalstärke festgestellt werden, was eine Reduktion von  $[K^+]_i$  impliziert. Die quantitative Auswertung der  $[K^+]_i$ -Abnahme (Abb. 3.4 D) bestätigte einen signifikant größeren Verlust von  $K^+$  im Zytoplasma der WT-Kardiomyozyten gegenüber den Slack-defizienten KO-Zellen (WT:  $0,32 \pm 0,03$ ; Slack KO:  $0,21 \pm 0,03$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Diese Ergebnisse bekräftigen die Untersuchungen zur

$[K^+]_{ex}$ -Dynamik (Abb. 3.3 B). Hier war entsprechend nach Niclosamid-Stimulation eine stärkere  $K^+$ -Akkumulation mutmaßlich via Efflux durch Slack-Kanäle in den WT-Kardiomyozyten zu beobachten.

Zusammen erlauben die Daten der in Kapitel 3.2 beschriebenen *in vitro* Untersuchungen die Schlussfolgerung, dass der kardiale Slack-Kanal regulatorisch an der zellulären bzw. zytoplasmatischen  $K^+$ -Dynamik entlang des Sarkolemms beteiligt ist.



**Abb. 3.4 FRET-basierte Untersuchungen zur Erfassung der  $[K^+]_i$ -Dynamik von WT- und Slack KO-Kardiomyozyten**

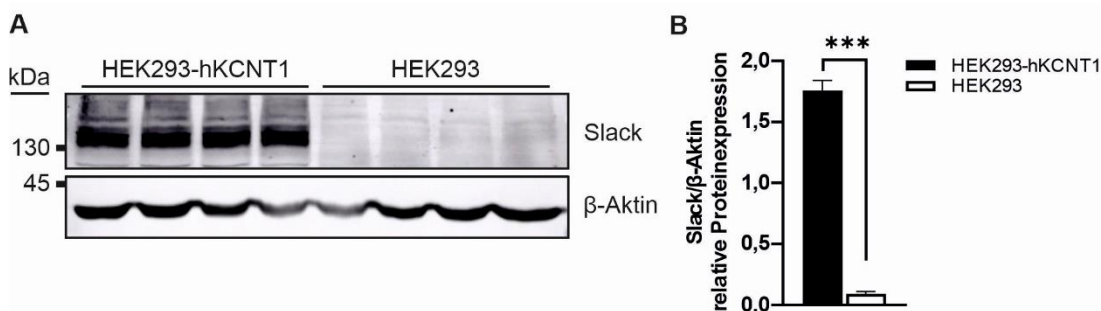
FRET-basierte  $[K^+]_i$ -Messungen in isolierten WT- und Slack KO-Kardiomyozyten nach viraler Transduktion mittels AV5 und zytoplasmatischer Expression von NES I $\alpha$ -LysM GEPII 1.0. **(A)** Immunfluoreszenz-Aufnahmen zur Visualisierung der Sensordistribution in vitalen Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen unter unbehandelten Basalbedingungen. **(B)** Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach Niclosamid-Stimulation zur Visualisierung der Genotyp-unabhängigen Verkürzung der Sarkomerstruktur. **(A-B)** Es sind die FRET- (gelb), CFP- (blau) und überlagerten Fluoreszenz-Signale der NES I $\alpha$ -LysM GEPII 1.0-gekoppelten Fluorophore gezeigt. **(C)** Normalisierte und gemittelte FRET Ratio-Signale von WT- (schwarze Kurve) und Slack KO-Kardiomyozyten (graue Kurve) unter Niclosamid-Stimulation. **(D)** Quantifizierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Signale nach Niclosamid-Stimulation bezogen auf die *baseline* (200 s) bestätigte eine signifikant höhere  $[K^+]_i$ -Abnahme in WT-Kardiomyozyten als in Slack-defizienten Zellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{WT} = 20$  Zellen (3 Präparationen),  $n_{Slack\ KO} = 18$  Zellen (3 Präparationen), \*\* p < 0,01. Die Daten wurden zusammen mit Sophia Schanz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.

### 3.3 Charakterisierung des Slack-Kanals in HEK293-hKCNT1-Zellen

Aufgrund der Fragilität des kardiomyozytären Zelltyps wurde zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Slack auf die  $[K^+]_i$ -Dynamik, ein HEK293-Zellsystem als Surrogat verwendet. In Kooperation mit Prof. Dr. Achim Schmidtke (Institut für Pharmazie und Klinische Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt a.M) wurden HEK293-hKCNT1-Zellen zur Verfügung gestellt, die den humanen Slack-Kanal (hKCNT1) stabil überexprimieren. Als Slack-Negativkontrolle fungierten genetisch bzgl.  $K_{Na}$ -Kanalstatus unveränderte HEK293-Kontrollzellen.

#### 3.3.1 Expressionsnachweis von Slack in HEK293-hKCNT1-Zellen

Der Nachweis der Slack-Expression in hKCNT1-überexprimierenden HEK293-Zellen war von großer Wichtigkeit für den weiteren Einsatz dieser Zelllinie als Surrogat. Die Western Blot-Analyse bestätigte auf Proteinebene eine deutliche Proteinbande bei ca. 140 kDa in HEK293-hKCNT1-Zelllysaten, wohingegen eine entsprechende Proteinbande in den Slack-negativen HEK293-Kontrollzellen nicht nachweisbar war (Abb. 3.5 A). Die Quantifizierung der relativen Proteinexpression, normiert auf die Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin, bestätigte außerdem eine hochsignifikante Überexpression im HEK293-hKCNT1-Zellmodell (Abb. 3.5 B) (HEK293-hKCNT1:  $1,76 \pm 0,07$ ; HEK293:  $0,09 \pm 0,02$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



#### Abb. 3.5 Expressionsanalyse von Slack in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen

(A) Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Slack-Überexpression in HEK293-hKCNT1-Zellen. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin. (B) Quantifizierung der relativen Proteinexpression von Slack in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{HEK293-hKCNT1} = 4$ ,  $n_{HEK293} = 4$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Justine Koik zusammen mit Dr. Rebekka Ehinger generiert.

### 3.3.2 FRET-basierte $[K^+]_i$ -Messungen in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen

Die  $[K^+]_i$ -Messungen an HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen erfolgten nach transienter Transfektion dieser Zellen mit dem  $K^+$ -Sensor NES Ic-LysM GEPII 1.0 (Durchführung siehe 2.8.5). Der Transfektionserfolg wurde nach einer Kultivierungszeit von 24 h und 48 h durch zusätzliche Zellkernfärbung (DAPI) quantitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie erfasst (Abb. 6.3). Es zeigte sich dabei insbesondere nach 24 h eine hohe und annähernd identische Effizienz, die sich fortan als Standardinkubationszeit nach Transfektion für die vorliegende Arbeit etablierte (HEK293-hKCNT1, 24 h:  $57,31 \pm 8,63$ ; HEK293, 24 h:  $47,40 \pm 6,39$ ).

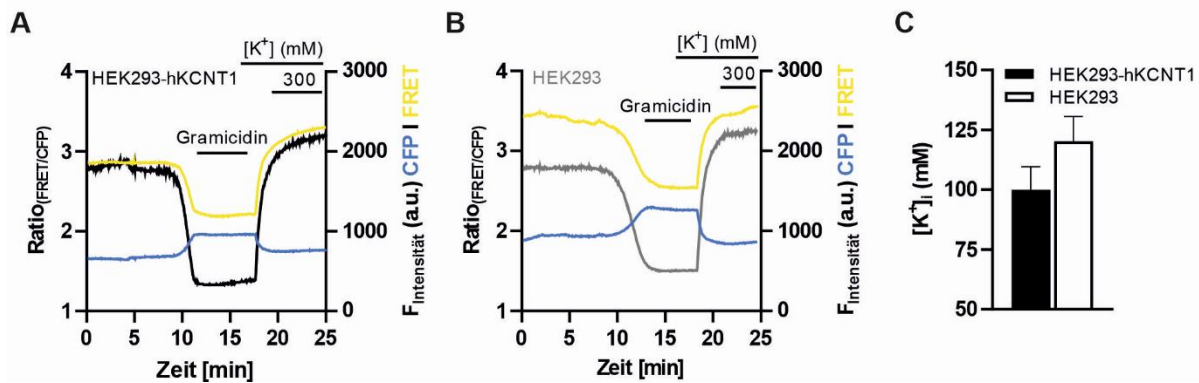
Im Rahmen weiterer Etablierungsarbeiten wurden Gramicidin-vorbehandelte HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen einer steigenden  $K^+$ -Konzentration von 1 mM bis 300 mM ausgesetzt, um die  $K^+$ -Sensitivität des zytosolischen Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 zu untersuchen. Wie in Abb. 6.4 A und B (siehe Anhang) dargestellt, zeigte sich anhand der  $K^+$ -Verdünnungsreihe ein ratiometrisches Verhalten der Fluorophor-vermittelten Signale CFP und FRET. Resultierend daraus bestätigte sich ein proportionaler Anstieg des FRET Ratio-Signals in Abhängigkeit der  $[K^+]_i$ -Zunahme. Die  $EC_{50}$ -Werte lagen für Slack-profiziente und -defiziente Zellen im erwarteten Bereich von ca. 60 - 80 mM (Abb. 6.4 C, D). Mithilfe dieser Werte konnte der absolute  $K^+$ -Gehalt der Zelllinien berechnet werden (Formel 3.1).

$$K^+_{absolut} = EC_{50} \cdot \frac{Ratio_{max}}{Ratio_{min}} \cdot \frac{Ratio_{max} - Ratio_{basal}}{Ratio_{min} - Ratio_{basal}}$$

#### Formel 3.1 Berechnung des absoluten $K^+$ -Gehalts

Gleichung zur Berechnung des absoluten  $K^+$ -Gehalts entsprechend (Bischof et al. 2017).

Um die Gleichung zu vervollständigen, benötigte es einen weiteren experimentellen Vorversuch, bei dem die Zellen zuerst mit Gramicidin für  $K^+$  permeabilisiert und anschließend mit 300 mM  $K^+$ -haltiger Lösung perfundiert wurden (Abb. 3.6 A, B). Durch dieses Protokoll konnte zum einen der minimale FRET Ratio-Wert nach vollständiger  $K^+$ -Entleerung der Zelle gemessen werden, zum anderen der maximale FRET Ratio-Wert nach Absättigung des zytosolischen  $K^+$ -Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0. Es resultierte ein  $K^+$ -Gehalt von  $99,97 \pm 9,41$  mM in HEK293-hKCNT1-Zellen, der deutlich unterhalb des  $K^+$ -Wertes von  $120,20 \pm 10,25$  mM in den korrespondierenden HEK293-Kontrollzellen lag.



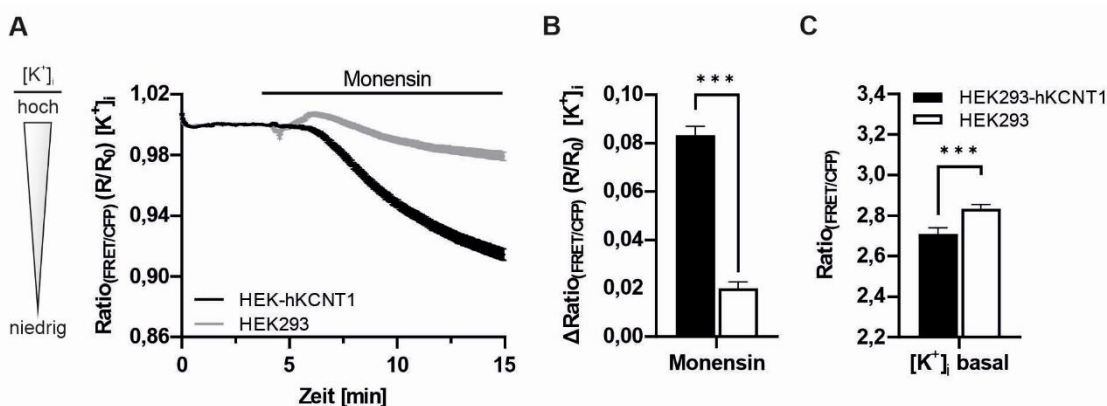
**Abb. 3.6 FRET-basierte Analyse zur Erfassung des absoluten K<sup>+</sup>-Gehalts in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen**

Repräsentative Kurvenverläufe unter Darstellung der ratiometrisch verlaufenden Fluoreszenzsignale von CFP (gelbe Kurve) und FRET (blaue Kurve) sowie der FRET Ratio-Signale von HEK293-hKCNT1 (schwarze Kurve) (A) und HEK293 (graue Kurve) (B). Ermittlung der minimalen und maximalen FRET Ratio-Werte durch Gramicidin-provozierte K<sup>+</sup>-Zellentleerung und anschließende Perfusion mit 300mM [K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub> zur Sensorsättigung. (C) Quantitative Darstellung des errechneten, absoluten K<sup>+</sup>-Gehalts in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen. Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{\text{HEK293-hKCNT1}}$ : 29 Zellen (2 Präparationen) und  $n_{\text{HEK293}}$ : 44 Zellen (2 Präparationen). Die Daten wurden zusammen mit Sophia Schanz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.

### 3.3.2.1 FRET-basierter Nachweis der Na<sup>+</sup>-sensitiven Aktivierbarkeit des Slack-Kanals

Nach Verifizierung der Sensorfunktionalität folgten Versuche zur ligandengesteuerten und pharmakologischen Modulation der HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen. Wie bereits eingangs (siehe 1.4) erläutert, wird die Kanalaktivität des Slack-Kanals durch [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> moduliert, wobei die Aktivierung des Kanals einen zytoplasmatischen K<sup>+</sup>-Efflux bewirkt (Kaczmarek 2013).

Um die Na<sup>+</sup>-abhängige Aktivierbarkeit von Slack zu untersuchen, wurde der Na<sup>+</sup>-Ionophor Monensin eingesetzt. Durch Komplexbildung mit Na<sup>+</sup> transportiert Monensin die Kationen elektroneutral durch die Plasmamembran in die Zelle (Tsuchida et al. 2021). Die Zunahme des intrazellulären Na<sup>+</sup>-Gehalts provozierte in Folge in den HEK293-hKCNT1-Zellen einen deutlichen K<sup>+</sup>-Efflux, was sich über das abnehmende FRET Ratio-Signal visualisieren lässt. In den HEK293-Kontrollzellen blieben die FRET Ratio-Signale unter diesen Messbedingungen dagegen weitestgehend stabil (Abb. 3.7 A). Die quantitative Erfassung der ΔFRET Ratio-Werte in Abb. 3.7 B impliziert einen signifikant erhöhten K<sup>+</sup>-Verlust aus dem Zytoplasma der HEK293-hKCNT1-Zellen gegenüber den HEK293-Kontrollzellen (HEK293-hKCNT1:  $0,083 \pm 0,004$ ; HEK293:  $0,019 \pm 0,003$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Monensin-induzierte [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Reduktion in HEK293-hKCNT1-Zellen lässt sich damit als K<sup>+</sup>-Ausstrom via Slack-Kanäle interpretieren und wird mutmaßlich aufgrund der höheren Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals bei [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg ausgelöst.



**Abb. 3.7 Untersuchung der  $[K^+]_i$ -Dynamik nach pharmakologischer Modulation des  $[Na^+]_i$ -Gehalts der Zellen mittels des  $Na^+$ -Ionophors Monensin**

(A) Applikation von Monensin führte zu einem Abfall des FRET Ratio-Signals in HEK293-hKCNT1-Zellen (schwarze Kurve). Der Ionophor-bedingte  $[Na^+]_i$ -Anstieg zeigte keine wesentliche Veränderung in HEK293-Kontrollzellen (graue Kurve). (B) Quantifizierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Werte nach Monensin-Stimulation bestätigte eine signifikante  $[K^+]_i$ -Reduktion in HEK293-hKCNT1 gegenüber HEK293-Kontrollzellen. (C) Basale FRET Ratio-Level sprechen für einen reduzierten  $[K^+]_i$ -Haushalt in Slack-exprimierenden HEK293-hKCNT1-Zellen unter physiologischen Bedingungen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{HEK293-hKCNT1}$ : 83 Zellen (5 Präparationen) und  $n_{HEK293}$ : 113 Zellen (6 Präparationen); \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Daten wurden von Dr. Helmut Bischof generiert.

Zudem zeigte sich auch in diesem experimentellen Ansatz, dass unter Basalbedingungen vor der Monensin-Behandlung ein vermindertes FRET Ratio-Signal in HEK293-hKCNT1 gegenüber den HEK293-Kontrollzellen zu beobachten war (Abb. 3.7 C) (HEK293-hKCNT1:  $2,71 \pm 0,03$ ; HEK293:  $2,83 \pm 0,02$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Das nicht-normierte FRET Ratio-Signal (Verlauf nicht gezeigt) korreliert dabei mit dem absoluten  $K^+$ -Gehalt der Zelle und deutet auf eine geringere  $[K^+]_i$  in Slack-überexprimierenden HEK293-hKCNT1 Zellen hin (siehe auch Abb. 3.6 C). Dieser Befund deutet auf eine basale Grundaktivität des Slack-Kanals im vorliegenden Zellsystem hin, d. h. einen permanent aktiven  $K^+$ -Ausstrom via Slack unter physiologischen Bedingungen.

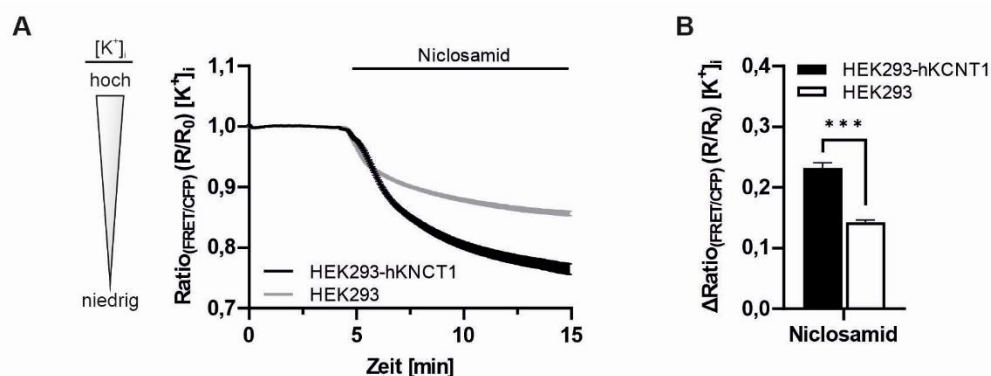
### 3.3.2.2 Betrachtung der $[K^+]_i$ -Dynamik nach Aktivierung des Slack-Kanals via Niclosamid

In weiteren FRET-basierten Untersuchungen wurde unter Verwendung von NES Ic-LysM GEPII 1.0 die  $[K^+]_i$ -Dynamik in HEK293-hKCNT1 in Abhängigkeit von direkten Slack-Modulatoren untersucht. Wie bereits für murine Kardiomyozyten gezeigt (Abb. 3.4), wurden auch HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen mit Niclosamid stimuliert.

Vorab wurde zunächst die Viabilität der Zellen nach 48-stündiger Exposition in Niclosamid-haltigem (0,03 nM bis 30  $\mu$ M) Medium betrachtet. Die Daten in Abb. 6.5 (siehe Anhang) weisen auf eine Dosis-abhängige Zunahme des Zelltods in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen hin. Für die folgenden FRET-basierten Messungen wurde eine Konzentration von 1  $\mu$ M Niclosamid festgelegt. Wie in Abb. 3.8 wiedergegeben, zeigte sich nach Zugabe des Slack-Aktivators eine Abnahme des FRET Ratio-Signals in beiden Zellsystemen, wobei die Amplitude und Steilheit des entsprechenden Abfalls der Signale in HEK293-hKCNT1 stärker

ausfiel. Eine signifikant größere  $[K^+]_i$ -Reduktion via Slack-Kanal stattfindendem  $K^+$ -Efflux in HEK293-hKCNT1-Zellen gegenüber den korrespondierenden HEK293-Kontrollzellen bestätigte sich durch Quantifizierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Werte (Abb. 3.8 B) (HEK293-hKCNT1:  $0,232 \pm 0,008$ ; HEK293:  $0,143 \pm 0,004$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die geringer ausfallende aber immer noch deutliche Veränderung der  $K^+$ -Homöostase in den Slack-defizienten HEK293-Kontrollzellen lässt sich über die zahlreichen Slack-unabhängigen Effekte des Niclosamids erklären (Chen et al. 2018b).

Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass die Expression des Slack-Kanals von Bedeutung ist für die Regulation des Ionenhaushalts der Zelle und dass der Kanal einen wesentlichen Beitrag zur  $Na^+$ -abhängigen  $[K^+]_i$ -Dynamik leisten kann.



### Abb. 3.8 Untersuchung der $[K^+]_i$ -Dynamik nach pharmakologischer Modulation der Kanal-Aktivität mittels Slack-Aktivator Niclosamid

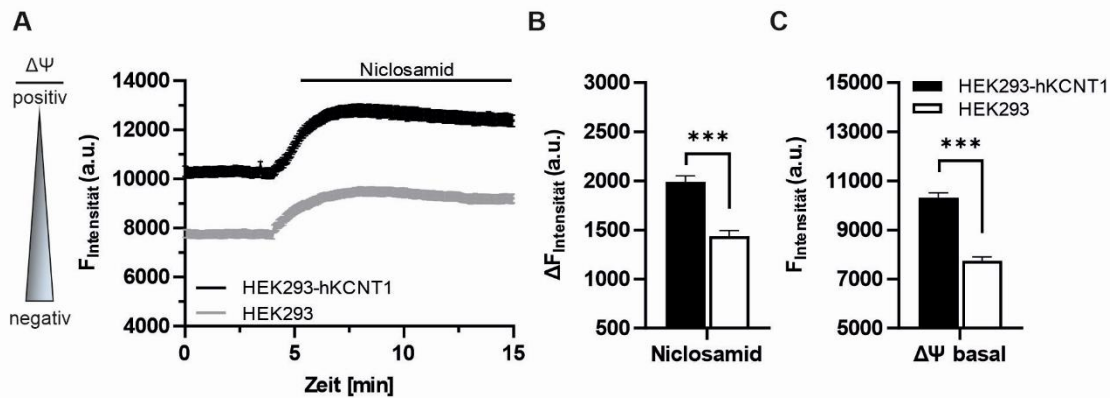
**(A)** Applikation von  $1 \mu M$  Niclosamid führte zu einem deutlichen Abfall des FRET Ratio-Signals in HEK293-hKCNT1-Zellen (schwarze Kurve). Die Amplitude und Steilheit der FRET Ratio-Signaländerungen fiel in den HEK293-Kontrollzellen (graue Kurve) geringer aus. **(B)** Die Quantifizierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Werte nach Niclosamid-Stimulation ergab entsprechend eine signifikant größere  $[K^+]_i$ -Reduktion in HEK293-hKCNT1 gegenüber den HEK293-Kontrollzellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{HEK293-hKCNT1}$ : 90 Zellen (6 Präparationen) und  $n_{HEK293}$ : 107 Zellen (6 Präparationen); \*\*\*  $p < 0,001$ . Ein identisches Verhalten zeigte sich auch bei Zellstimulation mit  $10 \mu M$  Niclosamid (Daten nicht gezeigt). Die hier gezeigten Daten wurden von Dr. Helmut Bischof generiert.

### 3.3.3 Regulation des Plasmamembranpotentials in HEK293-hKCNT1 versus HEK293-Kontrollzellen

Die Ionenverteilung einer Zelle auf den Intra- und Extrazellulärraum wird maßgeblich durch die Semipermeabilität der Plasmamembran reguliert. Gegeben durch die dabei entstehenden Ladungsunterschiede der einzelnen Ionen definiert sich in Summe die Transmembranspannung bzw. das Membranpotential (Chrysaftides et al. 2021; Wright 2004). Nachdem die vorangegangenen Experimente auf eine regulatorische Einflussnahme des funktionalen Slack-Kanals auf den  $K^+$ -Ionenhaushalt der Zelle hindeuten (siehe 3.3.2), wurden neben den FRET-basierten  $[K^+]_i$ -Untersuchungen zusätzliche fluoreszenzbasierte Membranpotentialmessungen an HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen durchgeführt. Die dafür eingesetzte spannungssensitive Membranpotentialsonde Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)-Trimethine Oxonol (DiBAC4(3)) bindet an intrazelluläre Proteine oder Membranen und gibt aufgrund Änderung der Fluoreszenzintensität (rote Spektralverschiebung) bei 516 nm Auskunft über das relative Plasmamembranpotential der Zelle (Brauner et al. 1984). Aufgrund der negativen Gesamtladung des Fluoreszenzfarbstoffs ist das Eindringen in Mitochondrien, d. h. die zusätzliche Erfassung des mitochondrialen Potentials, ausgeschlossen. Verschiebt sich das Plasmamembranpotential der Zelle beispielsweise durch Depolarisation und wird damit positiver, kommt es zu einem weiteren Einstrom des anionischen DiBAC4(3) und somit zu einer Fluoreszenzzunahme. Kurz: eine Zunahme des Fluoreszenzsignals impliziert eine Abnahme des Membranpotentials.

In Abb. 3.9 A sind die Intensitätsverläufe von DiBAC4(3) repräsentativ für das relative Plasmamembranpotential in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen gezeigt. Bereits unter Basalbedingungen im physiologischen Milieu zeichnete sich ein signifikant weniger polarisiertes Membranpotential in HEK293-hKCNT1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab (Abb. 3.9 C) (HEK293-hKCNT1:  $10315,17 \pm 200,26$ ; HEK293:  $7747,74 \pm 158,08$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Beobachtungen eines reduzierten  $[K^+]_i$ -Gehalts in den Slack-positiven Zellen (Abb. 3.6 C und Abb. 3.7 C), scheint die basale Kanalaktivität verantwortlich für eine Verschiebung des  $K^+$ -Nernstpotentials (siehe 6.6, Formel 6.1) und folglich der zellulären Transmembranspannung in HEK293-hKCNT1-Zellen zu sein.

Des Weiteren zeigte sich nach Stimulation der Zellen mit dem Slack-Aktivator Niclosamid eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von DiBAC4(3) in beiden Genotypen (Abb. 3.9 A). Die quantitative Auswertung (Abb. 3.9 B) bestätigte eine Niclosamid-provozierte Verschiebung des Potentials hinzu einem weniger negativen Membranpotential in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen (HEK293-hKCNT1:  $1989,82 \pm 60,63$ ; HEK293:  $1436,30 \pm 57,46$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Auch dieser Effekt korreliert mit der beobachteten  $[K^+]_i$ -Abnahme durch Niclosamid (Abb. 3.8) in beiden Zellsystemen, wobei das Ausmaß in HEK293-hKCNT1 gegenüber den HEK293-Kontrollzellen in beiden Fällen signifikant größer war. Zusammenfassend führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass die Slack-abhängige Verschiebung des  $[K^+]_i$ -Haushalt eine merkliche Verschiebung des elektrochemischen Gleichgewichts der Zelle zur Folge hat.



**Abb. 3.9 Membranpotentialmessungen in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen mittels DIBAC4(3)**

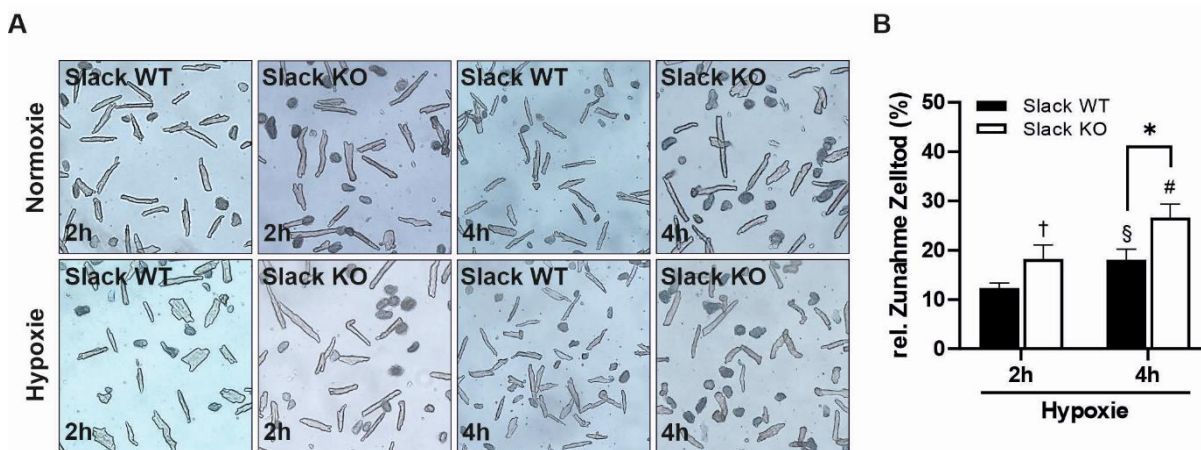
(A) Fluoreszenzmessung in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen nach Beladung mit der spannungssensitiven Membranpotentialsonde DIBAC4(3) unter physiologischen Basalbedingungen und anschließender Stimulation mit Niclosamid. (B) Quantitative Darstellung der Intensitätszunahme  $\Delta F_{\text{Intensität}}$  nach Niclosamid-Stimulation, die signifikant größer in HEK293-hKCNT1-Zellen ausfällt. (C) Die basal gemessenen DIBAC4(3)-Fluoreszenzintensitäten implizieren ein signifikant geringeres, d. h. weniger polarisiertes Membranpotential  $\Delta\Psi$  in Slack-überexprimierenden HEK293-hKCNT1-Zellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{HEK293-hKCNT1}}$ : 178 Zellen (5 Präparationen) und  $n_{\text{HEK293}}$ : 232 Zellen (6 Präparationen); \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Daten wurden von Dr. Helmut Bischof generiert.

### 3.4 Einfluss des Slack-Kanals auf das myozytäre Überleben bei Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro*

Die myozytäre Schädigung durch Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) *in vitro* ist ein gängiges Modell zur Untersuchung intrazellulärer Prozesse und kardioprotektiver Strategien der Zelle, um dem Infarktgeschehen entgegenzuwirken (Portal et al. 2013). Die zytotoxische Akkumulation von  $[\text{Na}^+]_i$  als Resultat der Ischämie/Hypoxie-provozierten ATP-Verarmung der Zelle und des Aktivitätsverlusts der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist ein Hauptfaktor für den zellulären Untergang (Ferdinandy et al. 2007; Fuller et al. 2003). Um dem Zelltod entgegenzutreten, wird die endogene Aktivierung von Slack diskutiert, welche durch einen  $[\text{Na}^+]_i$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Ausstrom eine Stabilisierung der depolarisierten Zelle bewirken könnte (Bhattacharjee & Kaczmarek 2005; Yuan et al. 2003).

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden adulte Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen isoliert und H/R *in vitro* (siehe 2.7.3) ausgesetzt. Kontrollzellen wurden unter normoxischen Bedingungen kultiviert, unter denen sich keine Genotyp-abhängigen Unterschiede zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Erfassung der relativen Zelltodrate nach H/R sollte Auskunft geben, ob der Slack-Kanal einen kardioprotektiven Einfluss auf das Zellüberleben unter Hypoxie ausübt. Durch Substrat- und  $\text{O}_2$ -Entzug *in vitro* wurden die Zellen für 2 h und 4 h einem hypoxischen Stimulus ausgesetzt. Das Ausmaß an Zelltod wurde dann nach weiteren 17 h Reoxygenierung mittels Trypanblau-Färbung quantitativ erfasst (Abb. 3.10 A). Neben der Blaufärbung der toten Kardiomyozyten ist die kugelförmige Morphologie der Zelle, d. h. der Verlust der Sarkomerstruktur aufgrund irreversibler Hyperkontraktion ein klares Indiz für Zelltod (Kang et al. 2000). Wie in Abb. 3.10 B dargestellt, zeigte sich erwartungsgemäß in Abhängigkeit der Zeit unter Hypoxie eine Zunahme an Zelltod in beiden

Genotypen. Dieser Effekt präsentierte sich bereits nach 2 h Hypoxie stärker ausgeprägt in myozytären Slack KO-Kulturen (WT, 2 h:  $12,30 \pm 1,03$  %; KO, 2 h:  $18,06 \pm 2,17$  %). Nach 4 h Hypoxie wurde eine signifikant erhöhte Zelltodrate gegenüber den WT-Kardiomyozyten nachgewiesen (WT, 4 h:  $18,19 \pm 2,89$  %; KO, 4 h:  $26,61 \pm 2,76$  %; \*  $p < 0,05$ ). Diese Datenlage sollte Anlass dafür sein, die Rolle des Slack-Kanals im pathophysiologischen Modell des MI *in vivo* zu untersuchen.



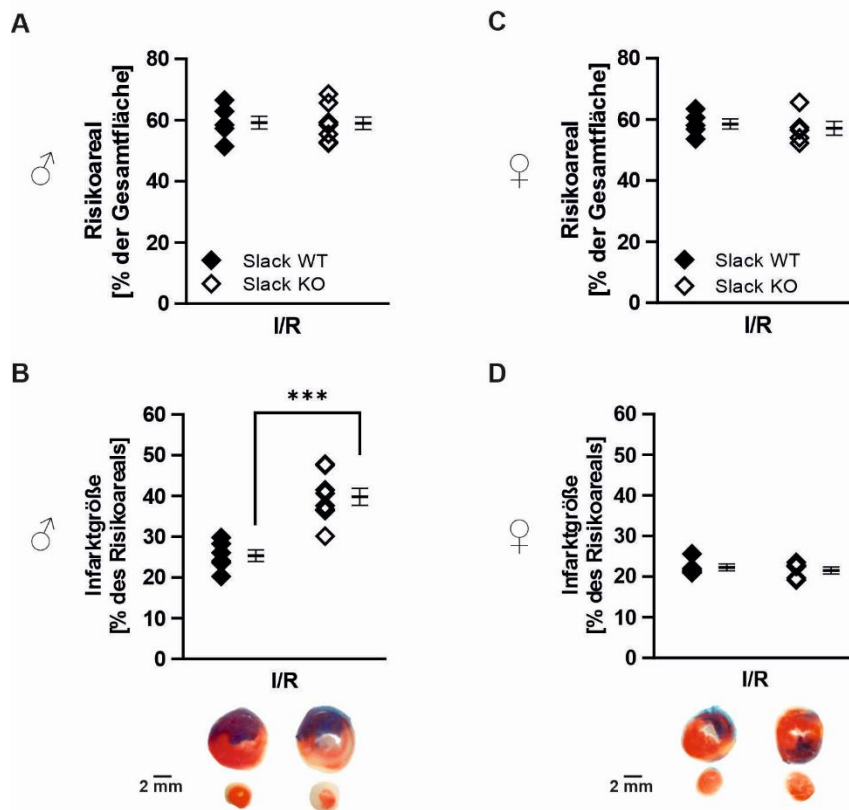
**Abb. 3.10 Untersuchungen zur Viabilität in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten mittels Trypanblau-Färbung nach Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro***

**(A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von WT- und Slack KO-Kardiomyozyten nach 2 h oder 4 h Hypoxie und 17 h Reoxygenierung. Die Visualisierung von Zelltod erfolgte durch Trypanblau-Färbung. Neben der Blaufärbung der Kardiomyozyten bestätigte die morphologische Veränderung hin zu einer runden Zellform den Verlust der Viabilität. **(B)** Quantitative Erfassung der relativen Zelltodrate bezogen auf die korrespondierende Normoxie-behandelte Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zeigte sich nach einer hypoxischen Periode von 4 h. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{WT}$ : 7 - 8 Isolationen und  $n_{Slack\ KO}$ : 8 Isolationen; \*  $p < 0,05$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die normoxische Kontrollgruppe wurde wie folgt dargestellt: †  $p < 0,05$ ; §  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,001$ . Die Daten wurden zusammen mit Justine Koik im Rahmen ihrer Masterarbeit generiert.

### 3.5 Bestimmung der Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt in globalen Slack KO-Mäusen

Nachdem sich eine erhöhte Vulnerabilität in Slack KO-Kardiomyozyten nach hypoxischem Stimulus *in vitro* abzeichnete (Abb. 3.10), sollte nachfolgend der Einfluss der globalen Slack-Deletion im akuten MI-Modell *in vivo* (siehe 2.4.4) untersucht werden. Hierzu wurden WT- und Slack KO-Mäuse im Alter von 9 - 16 Wochen durch Ligatur der LCA einer kardialen Ischämie für 30 min ausgesetzt, gefolgt von einer 120-minütigen Reperusionsphase. Für die statistische Analyse wurden die gefärbten Herzscheiben planimetrisch analysiert. Durch retrograde Evans Blue-Färbung unmittelbar vor der Herzentnahme wurde die ANAR blau eingefärbt. Die anschließende TTC-Färbung ermöglichte die Differenzierung zwischen dem rot gefärbten noch-intakten Gewebe und dem weiß verbleibenden nekrotischen Gewebe innerhalb der AAR. Es sind jeweils zwei repräsentative Herzscheiben distal der LCA-Okklusion, dem jeweiligen Genotyps zugeordnet, dargestellt (Abb. 3.11 ff.). Grundvoraussetzung für die statistische Analyse der Infarktgrößen war die Berechnung des Risikoareals als prozentualer Anteil der Gesamtfläche. Dieser Parameter diente als Kontrollgröße für die Reproduzierbarkeit des

Eingriffs (Abb. 3.11 A, C). Zwischen den Genotypen und den Geschlechtern bestätigte sich eine Gleichverteilung des Ligatur-betroffenen Risikoareals (WT, ♂:  $59,19 \pm 1,41$  %; Slack KO, ♂:  $58,95 \pm 2,02$  %; WT, ♀:  $58,51 \pm 1,67$  %; Slack KO, ♀:  $57,14 \pm 2,29$  %).



**Abb. 3.11 Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in WT- und globalen Slack KO-Herzen**

Die I/R-geschädigten Herzen zeigten ein identisches Risikoareal (% der Gesamtherzfläche) der WT- und Slack KO-Mäuse im männlichen (A) und weiblichen Geschlecht (C). (B) Die Infarktgröße (% des Risikoareals) der männlichen Slack KO-Tiere war signifikant erhöht gegenüber den männlichen WT-Mäusen. (D) Hingegen zeigte sich kein Vulnerabilitätsunterschied bei der Betrachtung der Infarktgröße zwischen den weiblichen WT- und Slack KO-Mäusen. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Geschlechts dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Die Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{WT, \delta}$ : 6 Tiere,  $n_{Slack\ KO, \delta}$ : 8 Tiere,  $n_{WT, \text{♀}}$ : 5 Tiere,  $n_{Slack\ KO, \text{♀}}$ : 5 Tiere; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Bei der Untersuchung der Infarktgröße (prozentualer Anteil des Risikoareals) im männlichen Geschlecht zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen WT- und Slack KO-Mäusen, wobei die Infarktareale nach I/R in den Slack-defizienten Männchen signifikant größer waren, was auf eine höhere Vulnerabilität des Herzmuskels in Abwesenheit von Slack hindeutet (Abb. 3.11 B) (WT, ♂:  $25,34 \pm 1,41$  %; Slack KO, ♂:  $39,79 \pm 2,10$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Interessanterweise wiederholte sich das übermäßige Infarktgeschehen der männlichen Slack KO-Herzen nicht im weiblichen Genotyp. Hier zeigten sowohl die Herzen der WT- als auch der Slack KO-Weibchen mittlere (und nicht signifikant unterschiedliche) Infarktgrößen zwischen 20 - 25 % (Abb. 3.11 D) (WT, ♀:  $22,31 \pm 0,85$  %; Slack KO, ♀:  $21,53 \pm 0,88$  %). Inwiefern der Hormonhaushalt (Östrogene, Progesteron) der prämenopausalen, weiblichen Tiere den I/R-Phänotyp beeinflusst, muss durch zukünftige Versuchsreihen geklärt werden

(Ostadal & Ostadal 2014). Um die initial postulierte, kardiorelevante Funktion des Slack-Kanals zu untersuchen, wurden alle weiteren *in vivo* Versuche (siehe nachfolgende Kapitel) im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich an männlichen WT- und Slack KO-Mäusen durchgeführt.

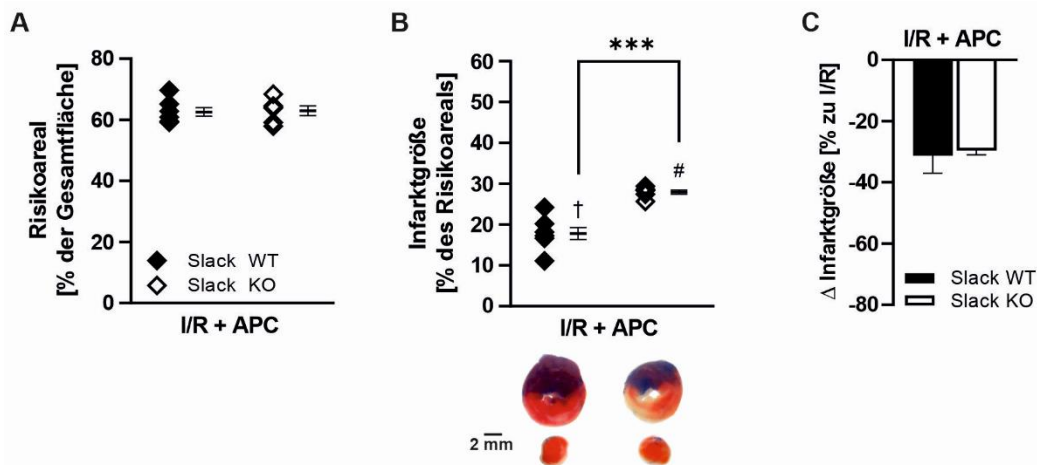
### **3.6 Einfluss verschiedener Konditionierungsstrategien auf den kardialen I/R-Schaden in globalen Slack KO-Mäusen**

#### **3.6.1 Volatile Präkonditionierung in globalen Slack KO-Mäusen**

Die volatile Präkonditionierung (APC) ist eine Konditionierungsstrategie, die im Tiermodell die mögliche Myokardschädigung nach I/R zu reduzieren vermag (Kwok & Aizawa 2004; Redel et al. 2009). In der vorliegenden Studie wurde der kardioprotektive APC-Effekt durch Verwendung des volatilen Anästhetikums Isofluran (1,3 Vol.-%) ausgelöst, das den Versuchstieren vor Beginn der Operation über eine Atemmaske für 30 min inhalativ zugeführt wurde (siehe 2.4.4.5).

Bei der Ermittlung des Kontrollparameters nach I/R + APC bestätigte sich ein stabiles Risikoareal von ca. 60 % in WT- und Slack KO-Herzen (Abb. 3.12 A). Die Administration von Isofluran bewirkte eine Reduktion der absoluten Infarktgröße in beiden Genotypen (Abb. 3.12 B) bezugnehmend auf die ursprüngliche Myokardschädigung nach I/R (Abb. 3.11 B). Die quantitative Erfassung der APC-induzierten Kardioprotektion (Abb. 3.12 C) ergab eine Verminderung der Infarktgröße um ca. 30 % in WT- und Slack KO-Herzen. Das identische Ansprechen der Herzen auf den APC-Stimulus spricht dafür, dass der Isofluran-vermittelte Schutzmechanismus *in vivo* unabhängig von Slack erfolgt.

Abgesehen davon konnte, wie in den vorausgegangenen Experimenten bereits beobachtet (Abb. 3.11 B), eine signifikant erhöhte Vulnerabilität in den Slack KO-Herzen gegenüber den WT-Kontrollen beobachtet werden (Abb. 3.12 B) (WT:  $17,82 \pm 1,49$  %; Slack KO:  $27,99 \pm 0,54$  %, \*\*\*  $p < 0,001$ ).



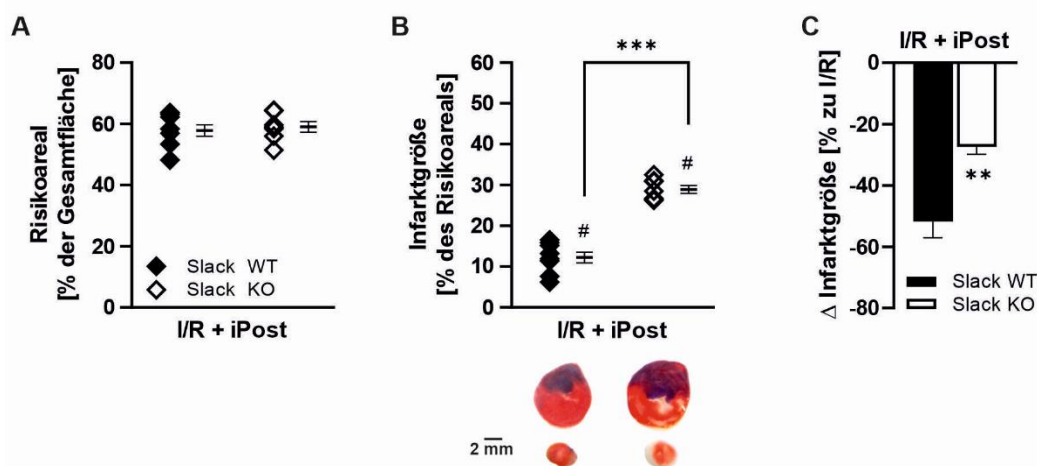
**Abb. 3.12 Erfassung des kardioprotektiven Effekts nach volatiler Präkonditionierung in WT- und Slack KO-Herzen**

(A) Die Risikoareale (% zur Gesamtherzfläche) zeigten keine Unterschiede zwischen WT- und Slack KO-Herzen nach I/R + APC. (B) Die Infarktgröße war signifikant erhöht in Slack KO-Herzen nach Inhalation des Anästhetikums Isofluran. (C) Prozentuale Veränderung der Infarktgröße nach APC bezogen auf I/R. Die APC-vermittelte Kardioprotektion führte zu einer Reduktion der absoluten Infarktgröße in beiden Genotypen. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß *plus* rot: Risikoareal (AAR)). Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{WT}$ : 6 Tiere,  $n_{Slack\ KO}$ : 8 Tiere, \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die jeweils korrespondierende, I/R-behandelte Gruppe (Abb. 3.11 B) wurde wie folgt dargestellt: †  $p < 0,05$ , #  $p < 0,001$ .

### 3.6.2 Ischämische Postkonditionierung in globalen Slack KO-Mäusen

Die ischämische Postkonditionierung (iPost) ist ein präklinisch gut etabliertes Verfahren und eine weitere, effiziente Methode zur Reduktion des I/R-induzierten Schadens *in vivo* (Heusch 2015, 2020; Zhao et al. 2003).

Die Risikoareal-Erfassung in Abb. 3.13 A verifizierte auch bei iPost *in vivo* eine stabile mittlere Größe von ca. 60 % in beiden Genotypen. Die wiederholte und kurzfristige Unterbrechung der LCA-Perfusion unmittelbar nach dem ischämischen Insult (siehe 2.4.4.6) führte zu einer Reduktion (Abb. 3.13 B) der ursprünglichen Infarktgröße nach I/R (Abb. 3.11 B) in beiden Genotypen (WT:  $12,22 \pm 1,33$  %; Slack KO:  $28,91 \pm 0,97$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Wie bereits in der Literatur beschrieben, bestätigte sich in Abb. 3.13 C eine iPost-vermittelte Infarktgrößenreduktion von ca. 50 % in den WT-Herzen (Frankenreiter et al. 2017; Methner et al. 2013). Im Slack KO lag das Ausmaß der iPost-vermittelten Reduktion der Infarktgröße dagegen bei ca. 25 % (\*\*  $p < 0,01$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass durch iPost ausgelöste kardioprotektive Signalwege zumindest teilweise Slack-abhängig den I/R-Schaden limitieren.



**Abb. 3.13 Infarktgrößenbestimmung nach ischämischer Postkonditionierung in WT- und globalen Slack KO-Herzen**

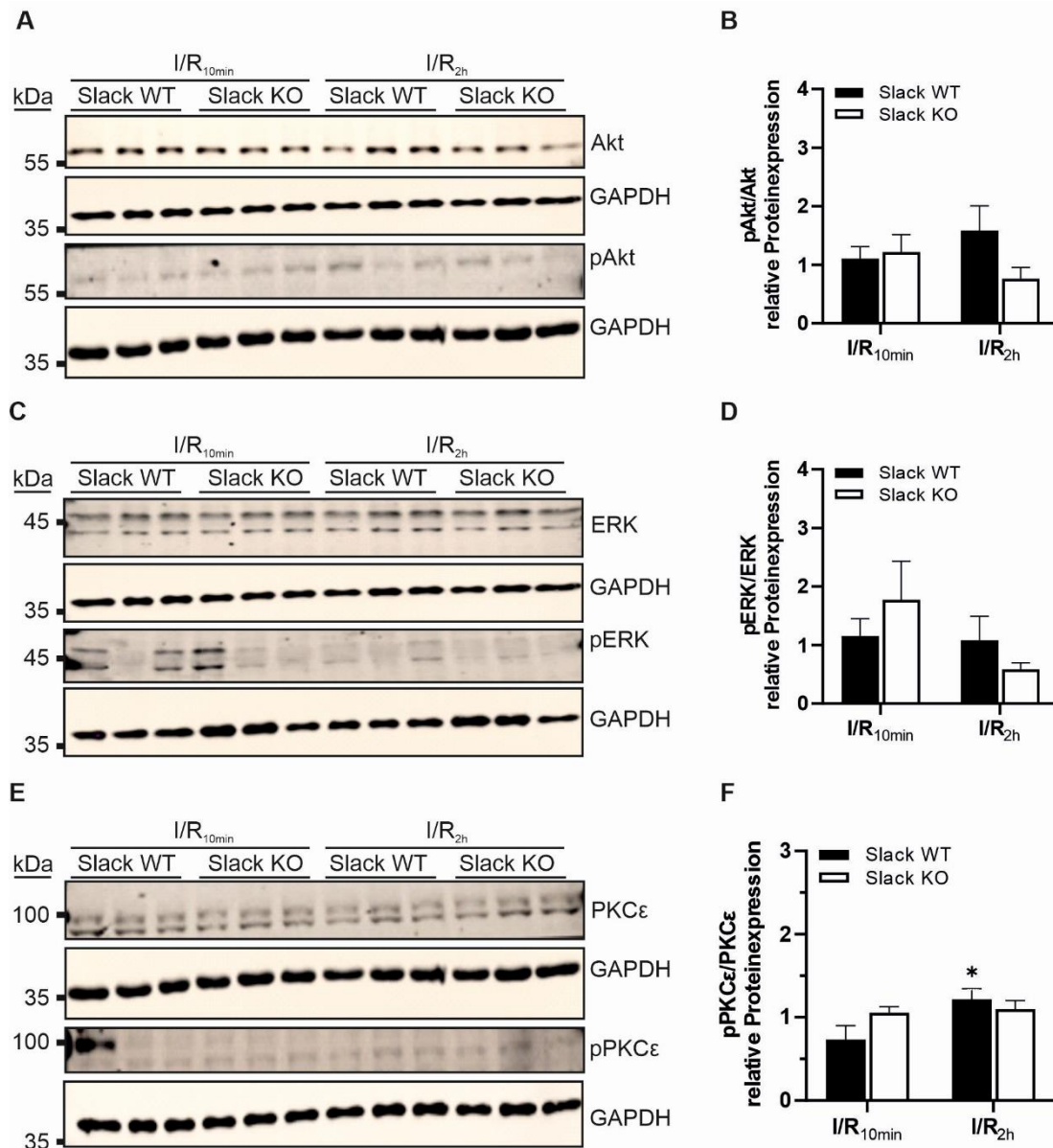
(A) Die Risikoareale (% der Gesamtherzfläche) in WT- und Slack KO-Herzen als Kontrollparameter bestätigten eine konstante Größe von ca. 60 % nach I/R + iPost. (B) Slack KO-Herzen zeigten eine signifikant größere Infarktgröße (% des Risikoareals) nach I/R + iPost im Vergleich zum WT. Die Infarktgrößen der iPost-konditionierten Herzen beider Genotypen waren geringer gegenüber dem ursprünglichen I/R-Schaden. (C) Prozentuale Veränderung der Infarktgröße nach I/R + iPost bezogen auf I/R. Slack KO-Herzen zeigten eine verminderte Protektion nach iPost als die WT-Kontrollherzen. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{WT}$ : 6 Tiere,  $n_{Slack\ KO}$ : 8 Tiere, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die jeweils korrespondierende, I/R-behandelte Gruppe (Abb. 3.11 B) wurde wie folgt dargestellt: #  $p < 0,001$ .

### 3.6.3 Quantitative Proteinanalyse verschiedener Mediatoren bei I/R *in vivo*

Der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Signalweg, erstmals beschrieben von Schulmann et al. 2002, ist ein myokardialer Schutzmechanismus, dessen Aktivierung z.B. über Adenosin, Bradykinin oder Opioide (siehe 1.2.2.1) zu einer Verminderung des I/R-Schadens führen kann (Schulman et al. 2002). Der kardioprotektive Effekt des RISK-Signalwegs beruht auf der Aktivierung von *pro-survival* Kinasen und verläuft in zwei parallel stattfindenden Kaskaden PI3K-Akt und MEK-ERK1/2, die letztlich zu einer Inhibition der mPTP u. a. via PKC $\epsilon$  beitragen (Rossello & Yellon 2018). Zudem wurde mehrfach in der Literatur gezeigt, dass diese Mechanismen wesentlich zur iPost-vermittelten Kardioprotektion beitragen (Hausenloy et al. 2005; Heusch 2015). Da die mechanische Konditionierung iPost einen verminderten Herzschutz in Slack-defizienten Herzen *in vivo* zeigte (Abb. 3.13), sollte nachfolgend ein möglicher Zusammenhang zwischen der Slack-Expression und der Proteinexpression wichtiger Mediatoren dieser protektiven Signalkaskaden bzw. deren Phosphorylierungslevels im pathophysiologischen Modell untersucht werden.

Hierzu wurden WT- und Slack KO-Mäuse zwei unterschiedlichen Protokollen des akuten MI-Modells *in vivo* unterzogen. Nach 30 min Ischämie und einer Reperfuionszeit von entweder 10 min (I/R<sub>10min</sub>) oder 2 h (I/R<sub>2h</sub>) folgte die Herzisolation an der Langendorff-Apparatur und Probenaufbereitung für die anschließende Western Blot-Analyse. Die repräsentativen Immunoblots in Abb. 3.14 A, C und E zeigen die Expressionsanalysen der *pro-survival*

Kinasen Akt und ERK1/2 sowie des zytoplasmatischen Mediators PKC $\epsilon$ . Die jeweilige Kinaseaktivität wurde anhand des Phosphorylierungslevels unter Verwendung geeigneter phosphospezifischer-Antikörper untersucht. Die Quantifizierung der phospho- zu pan-Proteinlevel der Kinasen pAkt/Akt bzw. pERK/ERK nach I/R<sub>10min</sub> und I/R<sub>2h</sub> ergab keinen regulatorischen Unterschied zwischen WT- und Slack KO-Herzlysaten (Abb. 3.14 B, D). Auch in Abhängigkeit der Reperfusionzeit (10 min vs. 2 h) zeigte sich kein statistisch relevanter Effekt für den jeweiligen Genotyp. Hingegen präsentierte sich mit zunehmender Reperfusionzeit nach dem 30-minütigen ischämischen Insult eine signifikante Steigerung des pPKC $\epsilon$ /PKC $\epsilon$ -Ratios ausschließlich in WT-Herzlysaten (WT, I/R<sub>10min</sub>:  $0,73 \pm 0,15$ ; WT, I/R<sub>2h</sub>:  $1,21 \pm 0,12$ ; \*  $p < 0,5$ ) (Abb. 3.14 F). Der Phosphorylierungsgrad der PKC $\epsilon$  in den Slack KO-Proben verblieb auf gleichbleibendem Niveau (Slack KO, I/R<sub>10min</sub>:  $1,05 \pm 0,06$ ; Slack KO, IR<sub>2h</sub>:  $1,10 \pm 0,09$ ). Aufgrund der Qualität des pPKC $\epsilon$ -Antikörpers sind weitere Untersuchungen notwendig um eine biologische Funktion des Slack-Kanals als möglichen Interaktionspartner der PKC $\epsilon$  am Herzen abschließend zu postulieren.

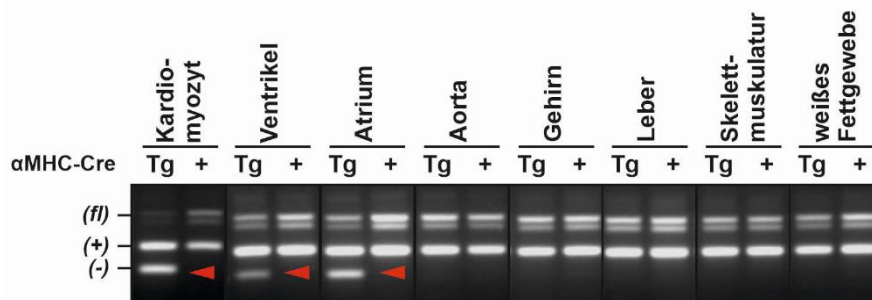


**Abb. 3.14 Expressions- und Aktivitätsanalyse der RISK-Mediatoren Akt und ERK1/2 sowie PKCε nach Ischämie und Reperfusion in WT- und Slack KO-Herzen**

Western Blot-Analyse zur Untersuchung der Proteinexpression von Akt (60 kDa) und pAkt (60 kDa) (**A**), ERK1/2 (42/44 kDa) und pERK1/2 (42/44 kDa) (**C**) sowie PKCε (90 kDa) und pPKCε (90 kDa) (**E**) in WT- und Slack KO-Herzen nach I/R<sub>10min</sub> und I/R<sub>2h</sub>. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Die quantitative Darstellung der relativen Proteinlevels von pAkt/Akt (**B**) und pERK/ERK (**D**) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen unabhängig von der Reperfusionzeit. (**F**) In Abhängigkeit der Reperfusionzeit bestätigte sich ausschließlich in den WT-Proben eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsstatus von pPKCε/PKCε. Laut Herstellerangaben entspricht die untere Bande dem Zielprotein PKCε, die für die Quantifizierung berücksichtigt wurde. Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{WT}$ : 6 Herzen und  $n_{Slack\ KO}$ : 5 - 6 Herzen, \*  $p < 0,05$ .

### 3.7 Generierung einer Kardiomyozyten-spezifischen Slack KO-Mutante unter Einsatz der $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase

Die Generierung einer Kardiomyozyten-spezifischen Slack KO-Mutante erfolgte unter Verwendung der konstitutiv aktiven  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase (Agah et al. 1997), deren Spezifität und Effizienz in der Literatur bereits gezeigt wurde (Frankenreiter et al. 2017). Die gezielte Ausschaltung des Slack-Gens in Kardiomyozyten wurde anhand einer genomischen PCR-Analyse unter Verwendung diverser Organproben von  $\alpha$ MHC-Cre-transgenen Mäusen erneut bestätigt (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15 Genomische PCR-Analyse zur Bestätigung der Kardiomyozyten-spezifischen Deletion des Slack-Kanals in  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> Slack<sup>fl/+</sup>-Mäusen**

Untersuchung des konditionalen Slack KO-Mausmodells mittels PCR-Analyse in unterschiedlichen Organen und Geweben von  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> Slack<sup>fl/+</sup>-Mäusen und  $\alpha$ MHC-Cre<sup>+/+</sup> Slack<sup>fl/+</sup>-Kontrolltieren. Die PCR-Amplikons bestätigten eine somatische Konversion des geflochtenen Slack-Allels (*fl*) zum (-)-Allel bei Anwesenheit der  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase ausschließlich in isolierten Kardiomyozyten, im Ventrikel und im Atrium (mit rotem Pfeil gekennzeichnet). Keine Rekombination zeigte sich in Kontrollgeweben beispielsweise der Aorta, dem Gehirn, der Leber, der Skelettmuskulatur und dem weißen Fettgewebe. Tg: Transgen, Slack (*fl*): 400 bp, Slack (+): 277 bp, Slack (-): 200 bp.

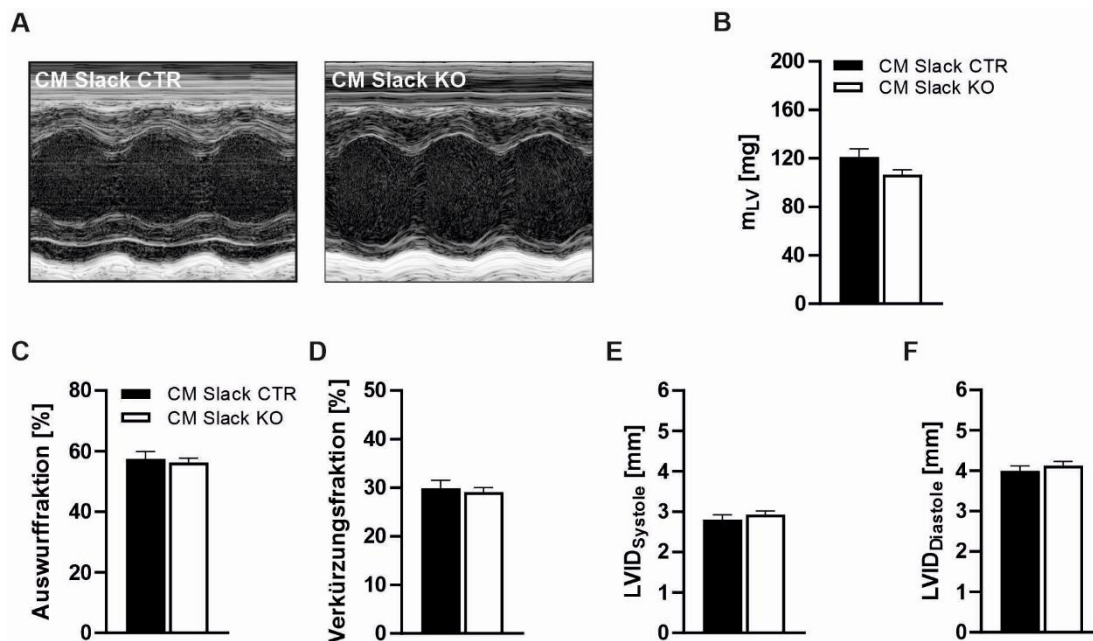
Hierzu wurden verschiedene Organe und Gewebe von  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> Slack<sup>fl/+</sup>-Mäusen und  $\alpha$ MHC-Cre<sup>+/+</sup> Slack<sup>fl/+</sup>-Kontrolltieren isoliert. Eine Konversion des geflochtenen (*fl*) Slack-Allels hin zu dem korrespondierenden KO (-)-Allel konnte ausschließlich in isolierten Kardiomyozyten, dem Ventrikel und dem Atrium von Cre-positiven Tieren detektiert werden. Dabei zeigte sich insbesondere in den PCR-Proben aus isolierten Kardiomyozyten eine nahezu vollständige Konversion. Hingegen zeigte sich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der ventrikulären und atrialen Proben eine noch sichtbare (*fl*)-Bande, die durch die Anwesenheit anderer Zelltypen am Herzen z. B. kardialer Fibroblasten und Glattmuskelzellen zu erklären ist. Erwartungsgemäß konnte in den kardialen Probenansätzen der Cre-negativen Kontrolltiere ausschließlich das (*fl*)-markierte Allel nachgewiesen werden. Auch in den entnommenen Kontrollgeweben Gehirn, Leber, Skelettmuskulatur und weißem Fettgewebe zeigte sich unabhängig vom  $\alpha$ MHC-Cre-Status der Mäuse ausschließlich das unveränderte, geflochte Slack-Allel.

### 3.8 Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps der CM Slack KO-Mauslinie

Nachfolgendes Kapitel beschäftigt sich mit der Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps der Kardiomyozyten-spezifischen Slack KO-Mausmutante (CM Slack KO,  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup>, Slack<sup>fl/-</sup>) (siehe 2.2.2.2). Bei der Verwendung des Cre/loxP-Modells zur Generierung dieser Mauslinie ist allerdings die potentiell DNA-schädigende Eigenschaft der  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase mit daraus resultierenden negativen Auswirkungen auf die kardiale Kontraktilität, Inflammation und Fibrosebildung am Herzen zu berücksichtigen (Pugach et al. 2015; Wang et al. 2020). Um diese möglichen kardiotoxischen Effekte zu berücksichtigen, wurde durch gezielte Verpaarung der Elterntiere (siehe 2.2.2.2) CM Slack CTR ( $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup>, Slack<sup>fl/+</sup>)-Versuchstiere generiert, die  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> entsprechend exprimieren. Die CM Slack KO-Mäuse zeigten im Alter von 8 bis 16 Wochen gegenüber ihren CM Slack CTR-Wurfgeschwistern keine Auffälligkeiten im Verhalten, der Entwicklung (Größe, Gewicht, Herzmasse) und dem Alter (Daten nicht gezeigt).

#### 3.8.1 Validierung der Herzfunktion mittels konventioneller M-Mode-Echokardiographie

Im Zuge der Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps der CM Slack-Mutanten wurden echokardiographische PSLAX-Messungen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die konventionelle M-Mode-Methode verwendet, die die Herzfunktion punktuell durch manuelle Positionierung einer Ultraschalllinie analysiert (siehe 2.4.6). Die eindimensionale Sicht der Ultraschallwellen-reflektierenden Strukturen ist in Abb. 3.16 A beispielhaft dargestellt. Bei der Erfassung der myokardialen Dimension präsentierte sich der linksventrikuläre Innendurchmesser (LVID) identisch groß für beide Genotypen sowohl in der Systole (Abb. 3.16 E) (CM Slack CTR:  $2,80 \pm 0,11$  mm; CM Slack KO:  $2,93 \pm 0,08$  mm) als auch in der Diastole (Abb. 3.16 F) (CM Slack CTR:  $4,00 \pm 0,12$  mm; CM Slack KO:  $4,13 \pm 0,09$  mm). Ebenso zeigte sich die linksventrikuläre Masse ( $m_{LV}$ ) in Abb. 3.16 B gleichermaßen „schwer“ in CM Slack CTR und CM Slack KO-Tieren (CM Slack CTR:  $121,01 \pm 6,25$  mg; CM Slack KO:  $106,51 \pm 3,60$  mg). Für die Darstellung der Myokardmechanik wurden die Parameter Auswurfraction (EF) (Abb. 3.16 C) und Verkürzungsfraktion (FS) (Abb. 3.16 D) vergleichend betrachtet (siehe 2.4.6). Auch funktional zeichneten sich keine Unterschiede in der Leistungsfähigkeit des linken Ventrikels ab (CM Slack CTR, EF:  $59,09 \pm 1,88$  %; CM Slack KO, EF:  $56,24 \pm 1,34$  %; CM Slack CTR, FS:  $30,96 \pm 1,33$  %; CM Slack KO, FS:  $29,09 \pm 0,87$  %). In Übereinstimmung mit den echokardiographisch-ermittelten Daten der globalen Slack-Mutante (Abb. 6.8), zeigten auch die CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäuse einen unauffälligen kardialen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen.



**Abb. 3.16 Konventionell echokardiographische Untersuchung der linksventrikulären Herzfunktion von Kardiomyozyten-spezifischen Slack Mutanten unter Basalbedingungen**

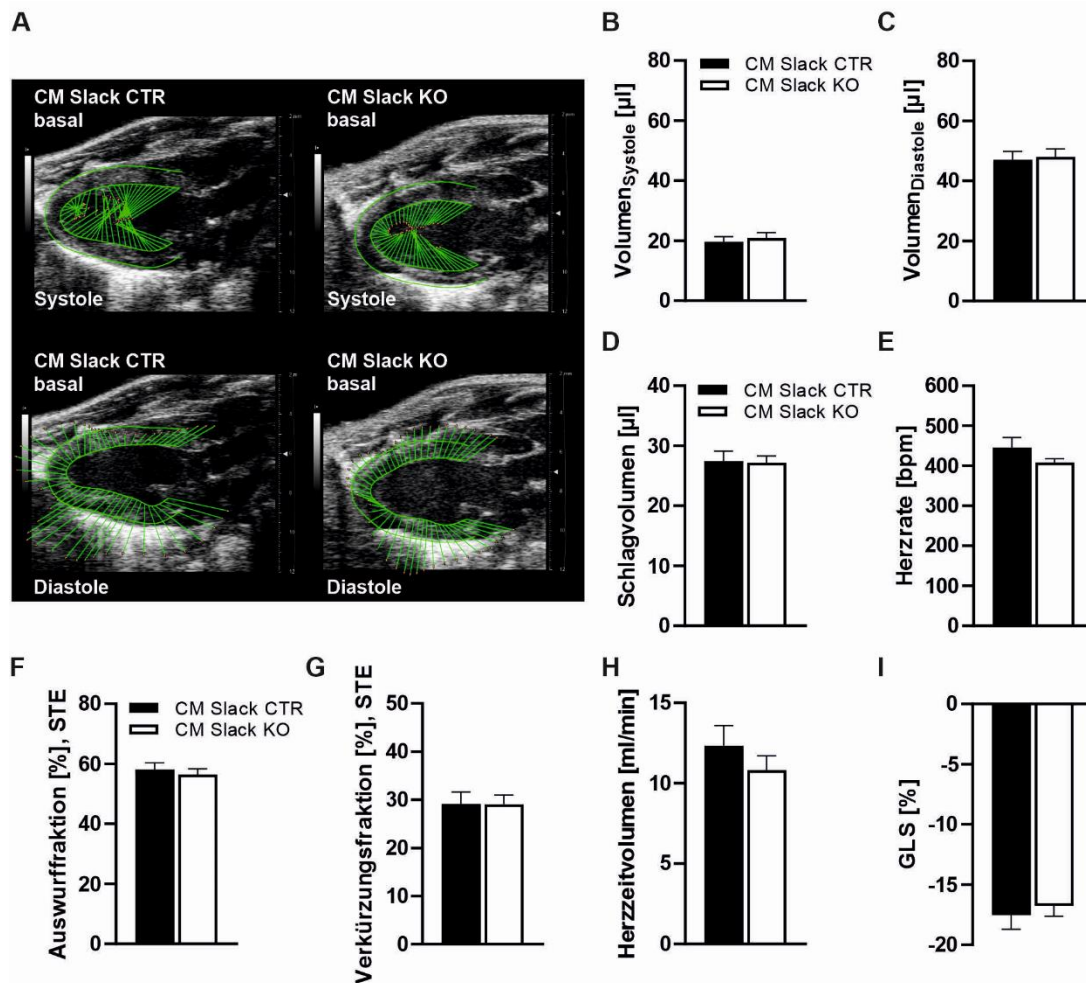
(A) Repräsentative M-Mode-Aufnahmen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen in PSLAX-Einstellung. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der linksventrikulären Masse ( $m_{LV}$ ) (B) oder dem Innendurchmesser (LVID) während der Systole (E) und der Diastole (F). Die Auswurfraction (EF) (C) und die Verkürzungsfraktion (FS) (D) bestätigten eine unveränderte, intakte Funktionalität des linken Ventrikels von CM Slack CTR und CM Slack KO. Die Messungen erfolgten bei einer stabilen Herzrate  $> 400$  bpm (Abb. 3.17 E). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{CM\ Slack\ CTR}$ : 6 - 7 Tiere und  $n_{CM\ Slack\ KO}$ : 6 - 7 Tiere gezeigt.

### 3.8.2 Darstellung der physiologischen Herzfunktion mittels ST-basierter Echokardiographie

Neben der traditionellen M-Mode-Methode (siehe 3.8.1) wurde die Herzfunktion von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen mittels STE ausgewertet. Als *speckle* wird das Grautonmuster verstanden, das sich durch die Wechselwirkung zwischen den Ultraschallwellen und dem Myokardgewebe ergibt (Mondillo et al. 2011). Bei dieser quantitativen Auswertmethode wird also die Bewegung der *speckles* und somit die Dehnung (Formveränderung) des Myokards während der Systole und der Diastole analysiert.

In grün dargestellte Richtungspfeile demonstrieren das physiologische Bewegungsmuster des linken Ventrikels von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen verteilt auf 48 Punkte entlang des Endokards (Abb. 3.17 A). Während der echokardiographischen Aufnahmen als Grundlage für die STE-basierte (siehe 3.8.2) und M-Mode-Analyse (siehe 3.8.1) zeigten die Tiere eine stabile HF von  $> 400$  bpm (Abb. 3.17 D) (CM Slack CTR:  $445,73 \pm 23,24$  bpm; CM Slack KO:  $408,10 \pm 9,01$  bpm). Bei der Berechnung der globalen Dehnung (GLS, *global longitudinal strain*) des Myokards präsentierten sich CM Slack CTR und CM Slack KO mit einer fast identisch effizienten Verkürzung des Myokards (Abb. 3.17 I) (CM Slack CTR:  $-17,54 \pm 1,07$  %; CM Slack KO:  $-16,77 \pm 0,81$  %). Als robuste Marker für die linksventrikuläre Funktion bestätigten sich auch eine intakte EF (Abb. 3.17 F) (CM Slack CTR:  $58,14 \pm 1,98$  %; CM Slack KO:  $56,43 \pm 1,78$  %) und eine effiziente FS (Abb. 3.17 G) (CM Slack CTR:

29,10 ± 2,33 %; CM Slack KO: 29,07 ± 1,79 %) in beiden Genotypen. Diese Ergebnisse stimmen mit den ermittelten Parametern in der M-Mode-Analyse in Kapitel 3.8.1 überein und implizieren die Gleichwertigkeit der technischen Auswertmethoden im physiologischen Modell. Zusätzlich erfasst die STE die minimalen und maximalen Blutvolumina innerhalb eines Herzzyklus. Das endsystolische Volumen (ESV) (Abb. 3.17 B) (CM Slack CTR: 19,61 ± 1,60 µl; CM Slack KO: 20,87 ± 1,73 µl) nach Entleerung des linken Ventrikels und das enddiastolische Volumen (EDV) (Abb. 3.17 C) (CM Slack CTR: 47,03 ± 2,63 µl; CM Slack KO: 48,06 ± 2,44 µl) nach erneuter Kammerfüllung zeigten keine Auffälligkeiten zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen. Konsequenterweise konnte ein identisches Schlagvolumen (SV) (Abb. 3.17 D) (CM Slack CTR: 27,43 ± 1,55 µl; CM Slack KO: 27,17 ± 1,05 µl) für beide Genotypen berechnet werden. Auch das Herzzeitvolumen (CO) (Abb. 3.17 H) bestätigte eine übereinstimmende Pumpleistung (Blutvolumen pro min) zwischen CM Slack CTR- (12,34 ± 1,15 ml/min) und CM Slack KO-Mäusen (10,81 ± 0,82 ml/min). Somit konnte auch mittels STE-basierter Analytik eine intakte Herzfunktion in den konditionalen CM Slack-Mutanten unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden.

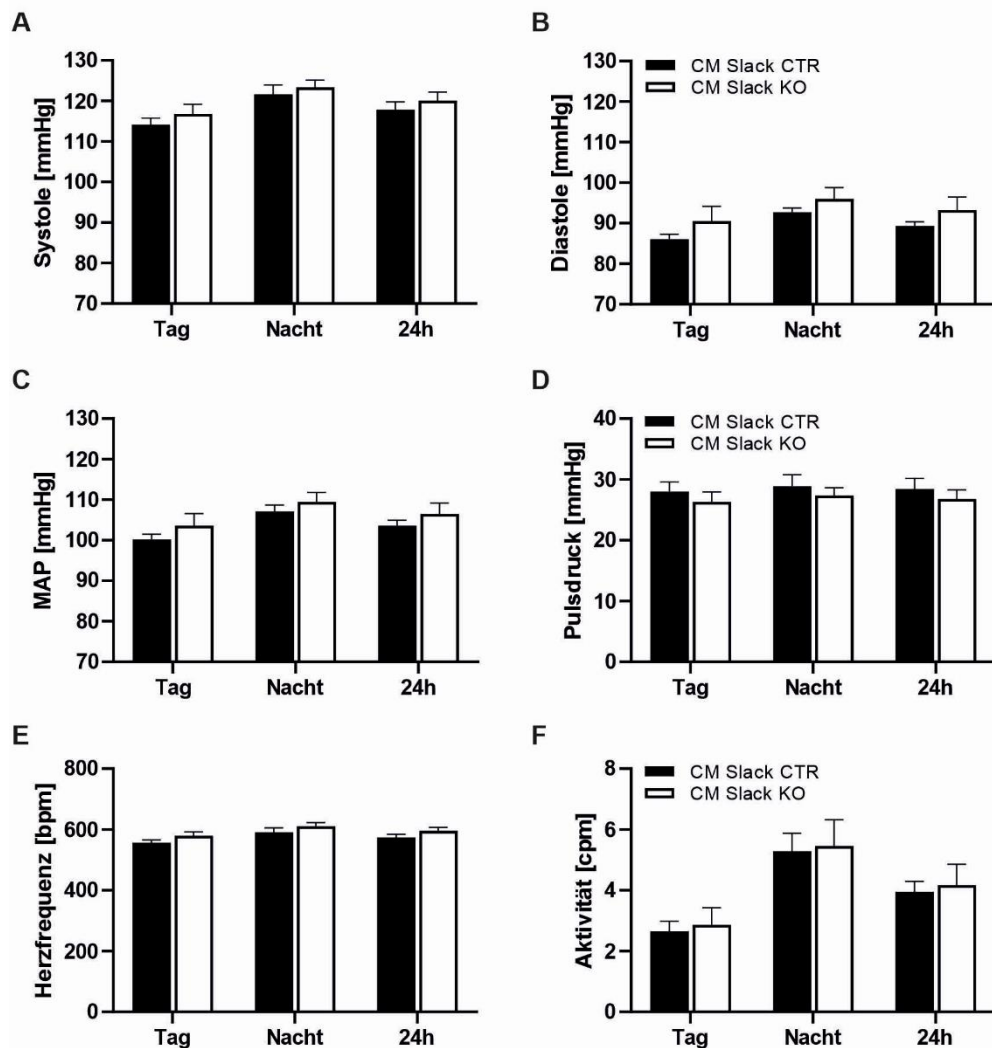


**Abb. 3.17 STE-basierte Analyse der linksventrikulären Funktion der Herzen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen**

(A) Repräsentative B-Mode-Aufnahmen von CM Slack CTR und CM Slack KO innerhalb eines Herzzyklus. Die grünen Pfeile, ausgehend von 48 endokardial positionierten Ausgangspunkten, demonstrieren die Myokarddeformation unter physiologischen Bedingungen. Die Blutvolumina der Endsystole (B) und Enddiastole (C) sowie das Schlagvolumen (D) und das Herzzeitvolumen (H) zeigten keine Auffälligkeiten zwischen den Genotypen. Die globale longitudinale Deformation (GLS, *global longitudinal strain*) (I), die Auswurfraction (F) und Verkürzungsfraction (G) bestätigten eine intakte Herzfunktion und identische Leistungsfähigkeit zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen. Die echokardiographischen Messungen erfolgten an Isofluran-anästhesierten Mäusen (1,5 - 2,0 Vol.-%) bei einer stabilen HF > 400 bpm (E). Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR}}$ : 6 - 7 Tiere und  $n_{\text{CM Slack KO}}$ : 6 - 7 Tiere.

### 3.8.3 Telemetrische Blutdruckmessung in CM Slack KO-Mäusen

Zur weiteren Untersuchung der kardiovaskulären Eigenschaften von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen wurde das Telemetriesystem der Firma DSI (siehe 2.4.7) eingesetzt. Mithilfe der implantierbaren Telemetriesensoren war ein physiologisches Überwachen des Blutdrucks, der HF und der Bewegungsaktivität im 24 h Zeitfenster (Tag und Nachtperiode) möglich (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18 Telemetrie-basierte Untersuchung der physiologischen Blutdruckregulation, der Herzrate und der Aktivität**

Die telemetrische Blutdruckmessung zeigte einen unveränderten systolischen (**A**) und diastolischen Blutdruck (**B**) in CM Slack KO- und CM Slack CTR-Mäusen. Ebenso resultierten identische Messwerte für den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) (**C**) und den Pulsdruck (**D**). Die HF (**E**) lag stabil bei ca. 600 bpm in beiden Genotypen und die Tiere waren identisch aktiv zu Tag- und Nachtzeit (**F**). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR}}$ : 7 Tiere und  $n_{\text{CM Slack KO}}$ : 6 Tiere. Die Daten wurden zusammen mit Dr. Natalie Längst generiert.

Wie in Abb. 3.18 A und B dargestellt, zeigte sich unabhängig der kardiomyozytären Deletion des Slack-Kanals ein intakter systolischer (CM Slack CTR, 24 h:  $117,81 \pm 1,93$  bpm; CM Slack KO, 24 h:  $120,09 \pm 2,07$  bpm) und diastolischer Blutdruck (CM Slack CTR, 24 h:  $89,35 \pm 1,04$  bpm; CM Slack KO, 24 h:  $93,26 \pm 3,22$  bpm) in beiden Genotypen. Zudem bestätigte sich ein unveränderter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) (CM Slack CTR, 24 h:  $103,59 \pm 1,38$  mmHg; CM Slack KO, 24 h:  $106,49 \pm 2,69$  mmHg) (Abb. 3.18 C) und ein physiologischer Pulsdruck, der sich aus der Differenz von Systole und Diastole errechnete (CM Slack CTR, 24 h:  $28,43 \pm 1,59$  mmHg; CM Slack KO, 24 h:  $26,81 \pm 1,32$  mmHg) (Abb. 3.18 D). Auch die HF (Abb. 3.18 E) präsentierte stabile Werte von ca. 600 bpm für beide Genotypen im nicht narkotisierten Zustand (CM Slack CTR, 24 h:  $573,46 \pm 10,17$  bpm; CM Slack KO, 24 h:  $595,42 \pm 10,65$  bpm). Darüber hinaus zeigten CM Slack CTR- und

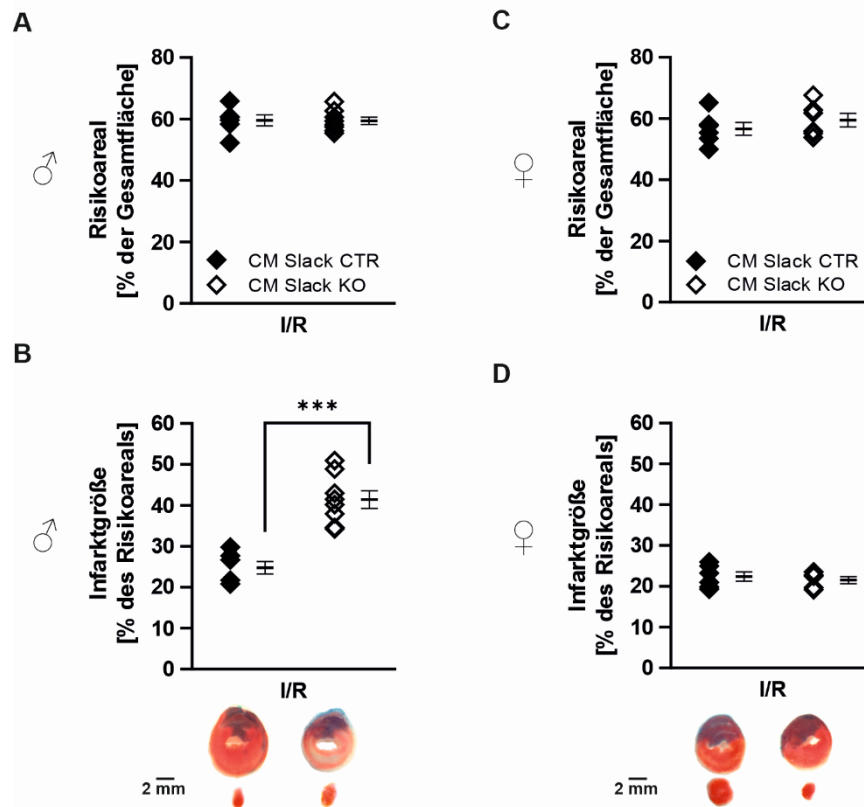
CM Slack KO-Tiere ein identisches Aktivitätsmuster (Abb. 3.18 F), d. h. eine reduzierte Bewegung während der Ruhephase am Tag (CM Slack CTR:  $2,66 \pm 0,30$  cpm; CM Slack KO:  $2,87 \pm 0,51$  cpm) und eine gesteigerte Aktivität zu Nachtzeiten (CM Slack CTR:  $5,28 \pm 0,0,54$  cpm; CM Slack KO:  $5,45 \pm 0,79$  cpm). Zusammenfassend sprechen auch die hämodynamischen Parameter für einen physiologisch regulierten und unauffälligen kardiovaskulären Phänotyp der CM Slack KO-Mäuse.

### 3.9 Auswirkung der kardiomyozytären Slack-Deletion auf den I/R-Schaden *in vivo*

Ausgehend von den bisherigen Beobachtungen, d. h. einer erhöhten Vulnerabilität der globalen Slack KO-Tiere nach I/R *in vivo* (Abb. 3.11) und einem verstärkt auftretenden Zelltod isolierter Slack KO-Kardiomyozyten nach H/R *in vitro* (Abb. 3.10), sollte nachfolgend die Relevanz des kardiomyozytären Slack-Kanals unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden. Dafür wurden die konditionalen Mutanten und ihre Wurfgeschwisterkontrollen (siehe 3.7) dem akuten MI-Modell *in vivo* ausgesetzt. Wie bereits ausgeführt (siehe 2.4.4), erfolgte nach 30 min Ischämie und 2 h Reperfusion die Herzentnahme zur planimetrischen Infarktgrößenbestimmung. Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 9 - 16 Wochen dabei getrennt untersucht.

Die Risikoareale bestätigen erneut die reproduzierbare Durchführung der *in vivo* Eingriffe an den CM Slack CTR und CM Slack KO (Abb. 3.19 A, C) (CM Slack CTR, ♂:  $59,55 \pm 1,79$  %; CM Slack KO, ♂:  $59,41 \pm 1,22$  %; CM Slack CTR, ♀:  $56,64 \pm 2,10$  %; CM Slack KO, ♀:  $59,50 \pm 2,21$  %). Im männlichen Geschlecht war zudem eine signifikant erhöhte Myokardschädigung bei I/R zu beobachten (Abb. 3.19 B) (CM Slack CTR, ♂:  $24,79 \pm 1,53$  %; CM Slack KO, ♂:  $41,42 \pm 2,15$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ), was mit der höheren I/R-Vulnerabilität der globalen männlichen Slack KO-Tiere übereinstimmt (Abb. 3.11 B). Das Ausmaß des I/R-Schadens (bezogen auf die absolute Infarktgröße) war dabei identisch für die globalen und Kardiomyozyten-spezifischen männlichen Slack KO-Mäuse (siehe 4.4.2, Abb. 4.2). Dies spricht dafür, dass die myokardiale Vulnerabilität bei I/R ausschließlich dem kardiomyozytär-exprimierten Slack-Kanal zuzuordnen ist.

Im weiblichen Geschlecht war zwischen den Genotypen dagegen kein Unterschied in den Infarktarealen zu beobachten (Abb. 3.19 D) (CM Slack CTR, ♀:  $22,40 \pm 1,12$  %; CM Slack KO, ♀:  $21,66 \pm 1,21$  %). Dieser erneute geschlechtsspezifische Unterschied kann, wie bereits ausgeführt (siehe 3.5) bis *dato* nicht erklärt werden. Die nachfolgenden *in vivo* Studien (Abb. 3.20 ff.) wurden daher erneut ausschließlich mit männlichen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen durchgeführt.



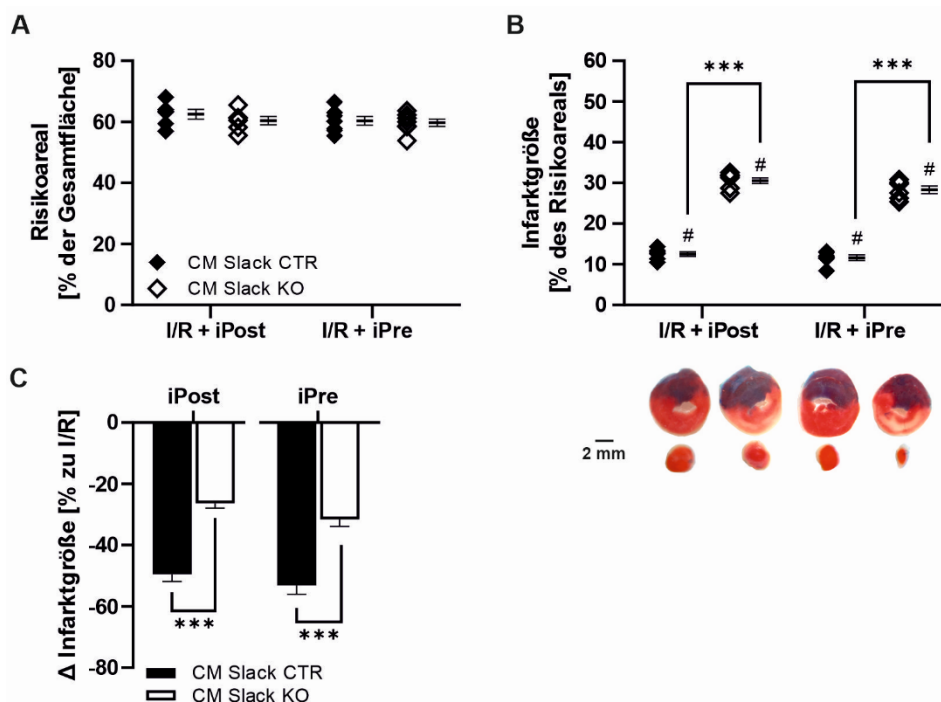
**Abb. 3.19 Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in Kardiomyozyten-spezifischen Slack-Mutanten**

Die I/R-geschädigten Herzen zeigten ein identisches Risikoareal (% der Gesamtherzfläche) in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen im männlichen (A) und weiblichen Geschlecht (C). (B) Die Infarktgröße (% des Risikoareals) der männlichen CM Slack KO war signifikant erhöht gegenüber der Infarktgröße der männlichen CM Slack CTR. (D) Es zeigte sich kein Unterschied in der Infarktgröße zwischen den weiblichen CM Slack CTR und weiblichen CM Slack KO. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps und Geschlechts dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Die Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{CM\ Slack\ CTR, \delta}$ : 6 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ KO, \delta}$ : 8 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ CTR, \text{♀}}$ : 6 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ KO, \text{♀}}$ : 6 Tiere; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.10 Modulation der Infarktgröße durch mechanische Konditionierung in CM Slack KO-Mäusen

Mechanische Konditionierungsstrategien erwiesen sich am ischämischen Herz als protektiv (Heusch 2015). Diese beruhen auf zusätzlichen ischämischen Reizen vor (iPre) oder nach (iPost) dem Hauptinsult und werden durch kurze manuelle Okklusion des vom Insult betroffenen Koronargefäßes gesetzt (Iliodromitis et al. 2007; Zhao et al. 2003). Nachdem die globale Deletion des Slack-Kanals zu einem Verlust kardialer Schutzfunktion durch iPost führte (Abb. 3.13), stellte sich die Frage, ob dieser Effekt der Ablation des kardiomyozytären Slack-Kanals geschuldet ist. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurden die konditionalen Mausmutanten (und deren Kontrollen) den mechanischen Konditionierungsregimen iPost und iPre (siehe 2.4.4.6) ausgesetzt.

Als Grundvoraussetzung für eine wissenschaftliche Interpretation der Daten bestätigte sich ein technisch konstantes Risikoareal unabhängig von der Konditionierungsart und dem Genotyp (Abb. 3.20 A) (CM Slack CTR, iPost:  $60,70 \pm 1,64$  %; CM Slack KO, iPost:  $59,46 \pm 1,08$  %; CM Slack CTR, iPre:  $62,49 \pm 1,58$  %; CM Slack KO, iPre:  $60,38 \pm 1,37$  %). In CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen führte iPost zunächst zu einer Reduktion der absoluten Infarktgröße nach I/R (Abb. 3.20 B) (CM Slack CTR:  $12,50 \pm 0,57$  %; CM Slack KO:  $30,52 \pm 0,68$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die prozentuale Darstellung der iPost-vermittelten Schutzfunktion in Abb. 3.20 C zeigte einen verminderten Effekt dieser Protektionsstrategie in CM Slack KO-Tieren auf (CM Slack CTR:  $-49,5 \pm 2,30$  %; CM Slack KO:  $-26,30 \pm 1,64$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Ein identisches Bild zeichnete sich auch bei der Durchführung der iPre ab, denn diese Konditionierungsstrategie führte in beiden Genotypen zu einer Reduktion der ursprünglichen Infarktgröße nach I/R unter Erhalt einer signifikant erhöhten Vulnerabilität im CM Slack KO (Abb. 3.20 B) (CM Slack CTR:  $11,61 \pm 0,70$  %; CM Slack KO:  $28,32 \pm 0,92$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Außerdem war erneut das prozentuale kardioprotektive Ausmaß (Abb. 3.20 C) in CM Slack KO-Herzen dem Effekt in CM Slack CTR-Herzen unterlegen (CM Slack CTR:  $-53,15 \pm 2,84$  %; CM Slack KO:  $-31,63 \pm 2,22$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Prinzipiell bewirkte die mechanische Konditionierung *in vivo* eine effiziente Infarktgrößenreduktion von ca. 50 % an den Herzen der CM Slack CTR-Mäuse. Dieser protektive Effekt konnte bei beiden Strategien iPost und iPre nicht in vollem Ausmaß in CM Slack KO-Tieren dargestellt werden, da hier die Schutzwirkung um > 40 % geringer ausfiel. Dies bestätigt die Annahme, dass der kardiomyozytäre Slack-Kanal an der iPre-/iPost-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist.



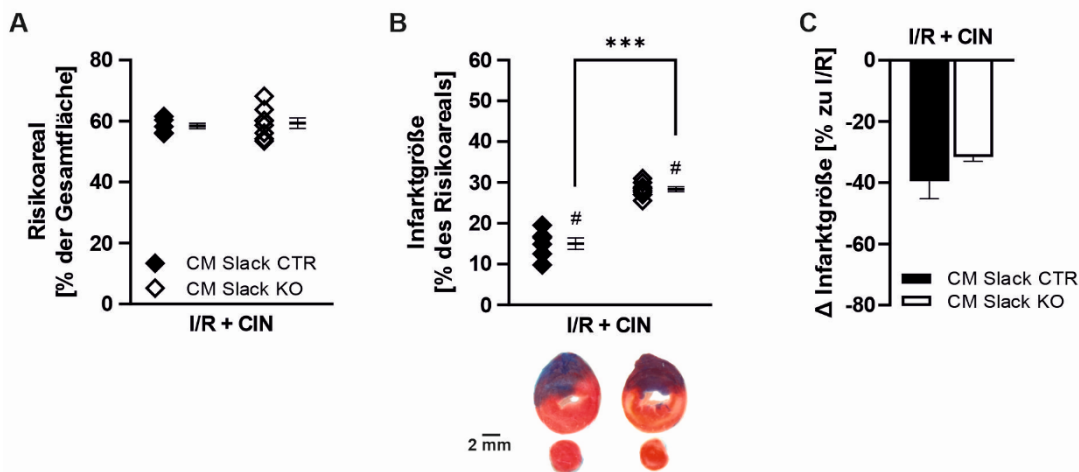
**Abb. 3.20 Erfassung der Infarktgröße nach ischämischer Prä- und Postkonditionierung in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen**

(A) Ermittlung des Risikoareals (% der Gesamtfläche) in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen nach ischämischer Post- (I/R + iPost) und ischämischer Präkonditionierung (I/R + iPre). Es resultierten identische Werte unabhängig des Genotyps oder der Konditionierungsart. (B) Die absoluten Infarktgrößen (% des Risikoareals) nach mechanischer Konditionierung zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Trotz iPost/iPre waren die Infarktgrößen in CM Slack KO-Hezen deutlich erhöht. (C) Prozentuale Veränderung der Infarktgrößen nach iPost und iPre bezogen auf I/R. Es bestätigte sich eine signifikant reduzierte mechanische Kardioprotektion in CM Slack-defizienten Hezen. Repräsentative Hezscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{\text{CM Slack CTR, iPost}}$ : 6 Tiere,  $n_{\text{CM Slack KO, iPost}}$ : 8 Tiere,  $n_{\text{CM Slack CTR, iPre}}$ : 6 Tiere,  $n_{\text{CM Slack KO, iPre}}$ : 6 Tiere, \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die jeweils korrespondierende, I/R-behandelte Gruppe (Abb. 3.19 B) wurde wie folgt dargestellt: #  $p < 0,001$ .

### 3.11 Pharmakologische Modulation des GC/cGMP/cGKI Signalwegs mittels Cinaciguat

Protektive Strategien zur Reduktion des myokardialen I/R-Schadens entsprechen einer komplexen Signaltransduktion, zu dieser neben dem RISK- (siehe 1.2.2.1) auch der kardiale GC/cGMP/cGKI-Signalweg zählen (Downey et al. 2008; Hausenloy & Yellon 2008; Heusch 2015). In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass die GC/cGMP/cGKI über mitochondriale  $K^+$ -Kanäle BK und  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  im Kardiomyozyt signalisiert und dadurch den I/R-Schaden über Mitoprotektion und zellulären Funktionserhalt positiv moduliert (Adler et al. 2020; Costa et al. 2008; Das et al. 2006; Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018; Lukowski et al. 2021; Soltysinska et al. 2014). Mithilfe des nachfolgend beschriebenen pharmakologischen Ansatzes *in vivo* sollte nun untersucht werden, ob auch der kardiomyozytäre Slack-Kanal eine Zielstruktur des cGMP-Signalwegs ist (siehe 2.4.4.7). Für

die Aktivierung der Signalkaskade wurde der GC-Aktivator Cinaciguat (Salloum et al. 2012) im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung vor dem ischämischen Insult *i.p.* appliziert. Die Erfassung des Risikoareals (Abb. 3.21 A) bestätigte zunächst die Reproduzierbarkeit der Technik unabhängig von der pharmakologischen Konditionierung (CM Slack CTR:  $58,41 \pm 0,91$  %; CM Slack KO:  $59,31 \pm 1,75$  %). Außerdem zeigte sich auch in dieser Kohorte eine erhöhte Vulnerabilität in CM Slack KO-Herzen bei I/R (Abb. 3.21 B). Die Administration von Cinaciguat führte zu einer Reduktion der Infarktgröße in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen (CM Slack CTR:  $14,99 \pm 1,40$  %; CM Slack KO:  $28,33 \pm 0,60$  %; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Zur Visualisierung des kardioprotektiven Effekts wurde die prozentuale Veränderung der Infarktgröße in Abb. 3.21 C dargestellt. Dabei war der Cinaciguat-vermittelte protektive Effekt gleichermaßen in beiden Genotypen ausgeprägt. Die tendenziell bessere Schutzwirkung in CM Slack CTR-Tieren ( $-39,54 \pm 5,66$  %) erreichte letztlich nicht das statistische Signifikanzniveau gegenüber den CM Slack KO-Mäusen ( $-31,60 \pm 1,45$  %). Demnach lässt sich schlussfolgern, dass Slack kein Element der GC/cGMP/cGKI-Signalkaskade bei I/R im Kardiomyozyt ist.



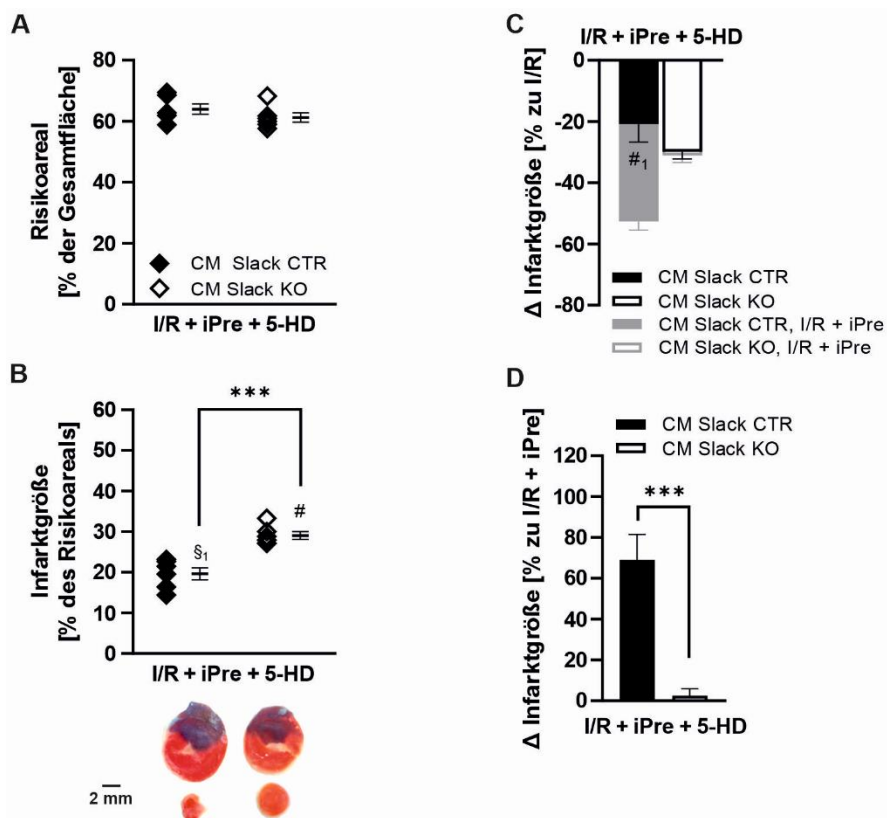
**Abb. 3.21 Untersuchung der Infarktgröße nach pharmakologischer Aktivierung des GC/cGMP/cGKI-Signalwegs mittels Cinaciguat**

**(A)** Ermittlung des Risikoareals (% der Gesamtherzfläche) in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R und zusätzlicher pharmakologischer Modulation mit dem GC-Aktivator Cinaciguat (CIN). Es zeigten sich keine Unterschiede im Risikoareal zwischen den Genotypen. **(B)** Die Infarktgrößen (% des Risikoareals) nach CIN-Administration waren gegenüber den I/R-geschädigten Herzen beider Genotypen signifikant reduziert. Die CM Slack KO-Herzen zeigten wiederholt einen größeren I/R-Schaden als CM Slack CTR-Herzen. **(C)** Prozentuale Veränderung der Infarktgrößen nach zusätzlicher CIN-Gabe bezogen auf I/R. Die cGMP-vermittelte Kardioprotektion zeigte ein statistisch identisches Ausmaß in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{\text{CM Slack CTR}}$ : 6 Tiere,  $n_{\text{CM Slack KO}}$ : 8 Tiere, \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die jeweils korrespondierende, I/R-behandelte Gruppe (Abb. 3.19 B) wurde wie folgt dargestellt: #  $p < 0,001$ .

### 3.12 Modulation des iPre-vermittelten Herzschutzes durch Administration des mitoK<sub>ATP</sub>-Inhibitors 5-Hydroxy-Decanoate (5-HD)

Der K<sup>+</sup>-Kanal mitoK<sub>ATP</sub> (Paggio et al. 2019) ist ein essentieller Mediator der kardioprotektiven Signaltransduktion, die durch iPre aktiviert wird (Downey & Cohen 2000; Gross 2000; Oldenburg et al. 2002). Bekanntermaßen vermindert die Administration des „selektiven“ mitoK<sub>ATP</sub>-Inhibitors 5-HD den protektiven Effekt von iPre am Herzen (Fryer et al. 2000; Sato et al. 2000; Wojtovich et al. 2013). Um der Fragestellung nachzugehen, ob mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle im Rahmen der Slack-abhängigen Kardioprotektion bei iPre eine Rolle spielen, wurde daher der Inhibitor 5-HD *i.p.* co-appliziert.

Konkret wurde 5-HD 45 min vor der Narkoseeinleitung eingesetzt, gefolgt von dem iPre-Protokoll und der Okklusion der LCA (siehe 2.4.4.7). Wie schon zuvor hatte auch diese Konditionierungsstrategie keinen Einfluss auf das Risikoareal in beiden Genotypen (Abb. 3.22 A) (CM Slack CTR: 63,95 ± 1,69 %; CM Slack KO: 61,21 ± 1,52 %), was die Gegenüberstellung des Infarktareals zu den infarzierten Arealen der vorausgegangenen Experimente (Abb. 3.19 B (I/R) und Abb. 3.20 B (I/R + iPre)) erlaubt. Bei der Betrachtung des myokardialen Schadens nach I/R + iPre + 5-HD (Abb. 3.22 B) wiederholte sich zunächst die erhöhte Vulnerabilität im CM Slack KO (CM Slack CTR: 19,63 ± 1,45 %; CM Slack KO: 29,05 ± 0,97 %; \*\*\* p < 0,001). Außerdem führte 5-HD zu einer Abschwächung des ursprünglichen iPre-vermittelten kardioprotektiven Effekts an den Herzen von CM Slack CTR-Mäusen (CM Slack CTR, I/R + iPre + 5-HD: 19,63 ± 1,45 %; CM Slack CTR, I/R + iPre: 11,61 ± 0,70 %; §<sub>1</sub> p < 0,01). Die Infarktgröße im Slack KO war hingegen 5-HD-insensitiv (CM Slack KO, I/R + iPre + 5-HD: 29,05 ± 0,97 %; CM Slack KO, I/R + iPre: 28,32 ± 0,92 %). Relativ gesehen ( $\Delta$  Infarktgröße [% zu I/R]) wurde das Ausmaß der iPre-abhängigen Protektion in den CM Slack CTR unter Co-Administration von 5-HD auf das Niveau der CM Slack KO reduziert (Abb. 3.22 C) (CM Slack CTR: -20,81 ± 5,86 %; CM Slack KO: -29,85 ± 2,33 %). 5-HD hatte hingegen keinen Einfluss auf die prozentuale Änderung der Infarktgröße in iPre-konditionierten Herzen von Slack-defizienten Mäusen (Abb. 3.22 D) ( $\Delta$  Infarktgröße [% zu I/R + iPre]: CM Slack CTR: -69,03 ± 12,51 %; CM Slack KO: -2,54 ± 3,41 %; p < 0,001). Offensichtlich hat die Deletion des in Kardiomyozyten exprimierten Slack-Kanals einen wesentlichen Einfluss auf die Infarkt-modulierenden Eigenschaften von 5-HD. Somit lässt sich schlussfolgern, dass ein mechanistischer Zusammenhang zwischen mitoK<sub>ATP</sub> und Slack bestehen könnte, der zu einem vollständigen Herzschutz durch iPre in den CM Slack CTR beiträgt.



**Abb. 3.22 Erfassung des kardialen Schadens nach ischämischer Präkonditionierung unter Inhibition der mitoK<sub>ATP</sub>-Funktion durch 5-Hydroxy-Decanoate**

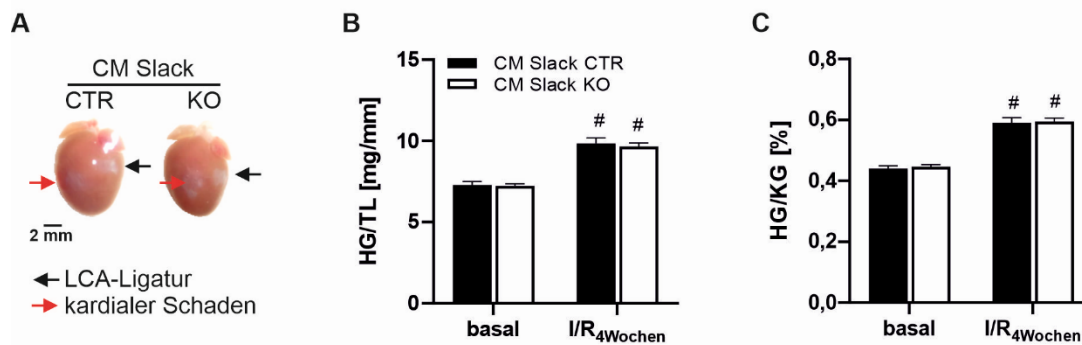
**(A)** Darstellung des Risikoareals (% der Gesamtherzfläche) nach I/R und zusätzlicher Präkonditionierung (iPre) sowie pharmakologischer Modulation mittels dem mitoK<sub>ATP</sub>-Inhibitor 5-Hydroxy-Decanoate (5-HD). Es zeigten sich keine Unterschiede im Risikoareal zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R + iPre + 5-HD. **(B)** Administration von 5-HD führte zu einer Reversion der iPre-vermittelten Kardioprotektion in CM Slack CTR-Herzen. Hingegen hatte die 5-HD-Administration keinen negativen Einfluss auf die Infarktgröße im CM Slack KO. Unabhängig davon bestätigte sich eine erhöhte Vulnerabilität im CM Slack KO im Vergleich zu den CM Slack CTR. **(C)** Prozentuale Veränderung der Infarktgrößen nach I/R + iPre + 5-HD bezogen auf I/R. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen. Die in grau eingezeichneten Balken (Abb. 3.20 B) präsentieren die ursprüngliche Infarktgrößenreduktion nach iPre und veranschaulichen den heterogenen Effekt von 5-HD in den Genotypen. **(D)** Prozentuale Veränderung der Infarktgrößen nach I/R + iPre + 5-HD bezogen auf I/R + iPre. Der Verlust an iPre-vermitteltem Herzschutz durch 5-HD war ausschließlich in den CM Slack CTR prominent. Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß *plus* rot: Risikoareal (AAR)). Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte ± SEM mit  $n_{CM\ Slack\ CTR}$ : 6 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ KO}$ : 6 Tiere, \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse bezugnehmend auf die jeweils korrespondierende, I/R-behandelte Gruppe (Abb. 3.19 B) wurde wie folgt dargestellt: #  $p < 0,001$ . Der Vergleich bezugnehmend auf die jeweilige I/R + iPre-behandelte Gruppe (Abb. 3.20 B) wurde zudem wie folgt hervorgehoben: §<sub>1</sub>  $p < 0,01$ , #<sub>1</sub>  $p < 0,001$ .

### 3.13 Auswirkungen der kardiomyozytären Slack-Deletion auf die Langzeitfolgen nach Myokardinfarkt

Nachdem sich im akuten MI-Modell eine erhöhte Vulnerabilität in CM Slack KO-Tieren gegenüber den CM Slack CTR-Mäusen abzeichnete (siehe 3.9 - 3.12), sollte nachfolgend untersucht werden, ob sich dieser vulnerable Phänotyp auch im Langzeitmodell bestätigen lässt. Die Langzeitfolgen eines MI wurden in Hinblick auf die linksventrikuläre Funktion und die myokardiale Umstrukturierung (z. B. Fibrosierung, Hypertrophie) untersucht. Für diese Untersuchungen wurde ein chronisches I/R-Modell *in vivo* gewählt (siehe 2.4.5), bei dem die Tiere durch die Okklusion der LCA eine 30-minütige Ischämie erfuhren worauf eine Reperusionszeit von 28 Tagen folgte. Die Schäden nach I/R<sub>4Wochen</sub> in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen wurden morphologisch, histologisch und echokardiographisch untersucht.

#### 3.13.1 Morphologische Veränderung der Herzen nach I/R<sub>4Wochen</sub>

Die morphologische Veränderung der Herzen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4Wochen</sub> ist in Abb. 3.23 A beispielhaft gezeigt. Das Perikard zeigte eine charakteristische weiße Verfärbung im Bereich der LCA-Ligatur (schwarzer Pfeil), welche auf die mechanische Verletzung des Gewebes zurückzuführen ist. Eine zweite weißlich-transparent erscheinende Region des Herzmuskels anterior des linken Ventrikels (roter Pfeil) bestätigte eine erfolgreiche Okklusion der LCA. Diese visuellen Veränderungen am Myokard demonstrieren die korrekte technische Durchführung des chronischen I/R-Modells und sind Grundvoraussetzung für die statistische Berücksichtigung der Herzen. Um die Veränderung der Herzmasse infolge von I/R<sub>4Wochen</sub> zu erfassen, wurde das relative Herzgewicht in Bezug auf die Tibialänge (Abb. 3.23 B) und das Körpergewicht (Abb. 3.23 C) bestimmt und den physiologischen Größen der unbehandelten Tiere (basal) gegenübergestellt. Erwartungsgemäß führte die I/R-bedingte Schädigung der Ventrikel zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Herzen beider Genotypen im Vergleich zu den gesunden, nicht-konditionierten Herzen ( $\# p < 0,001$ ). Weder unter Basalbedingungen noch nach I/R<sub>4Wochen</sub> zeigte sich dabei ein Unterschied im Herzgewicht zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen.



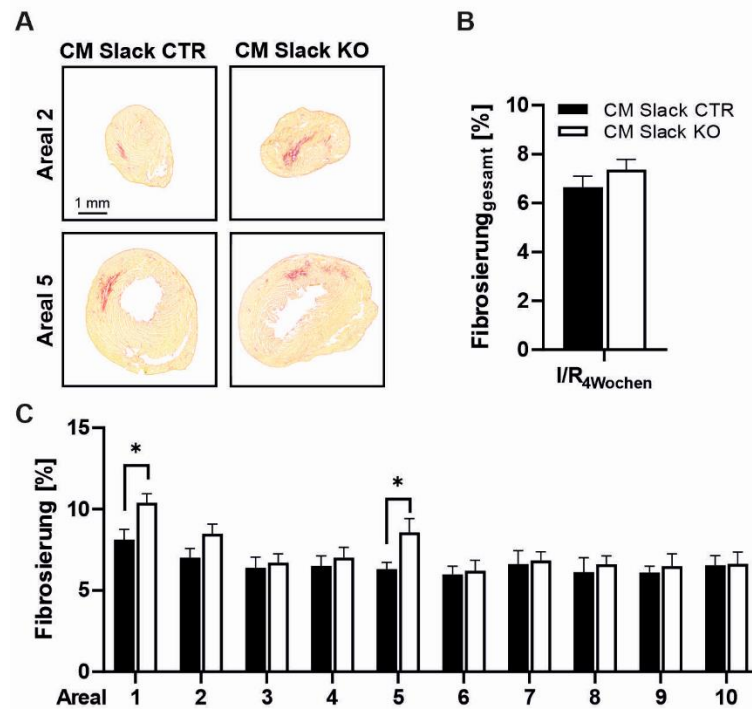
**Abb. 3.23 Makroskopische Bewertung der post-MI Infarktareale und Herzgewichte nach I/R<sub>4</sub>Wochen**

(A) Repräsentative Herzen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Die Herzen präentzündeten erkennbare, weißlich-transparente Verfärbungen des Myokards, die durch die LCA-Ligatur (schwarzer Pfeil) und die anterior-lokalisiertere kardiale Schädigung (roter Pfeil) verursacht werden. Die Erfassung der Herzgewichte bezogen auf die Tibialänge (TL) (B) und das Körpergewicht der Maus (KG) (C) zeigte eine Gewichtszunahme infolge von I/R<sub>4</sub>Wochen in beiden Genotypen im Vergleich zu den basalen Werten. Kein Unterschied war zwischen den CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen ersichtlich. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR, basal}}$ : 7 Tiere,  $n_{\text{CM Slack KO, basal}}$ : 6 Tiere,  $n_{\text{CM Slack CTR, I/R 4Wochen}}$ : 10 Tiere und  $n_{\text{CM Slack KO, I/R 4Wochen}}$ : 9 Tiere. Die statistische Analyse bezugnehmend auf das Behandlungsregime (I/R<sub>4</sub>Wochen vs. basal) wurde wie folgt dargestellt: #  $p < 0,001$ .

### 3.13.2 Fibrotische Veränderung der Herzstruktur nach I/R<sub>4</sub>Wochen

Die kardiale Fibrose infolge einer chronischen I/R-Schädigung am Herzen entsteht durch Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im kardialen Interstitium (Frangogiannis 2006; Humeres & Frangogiannis 2019; Rai et al. 2017). Durch den Ischämie-bedingten Untergang der Kardiomyozyten werden entsprechend reaktive bzw. reparative Fibrosierungsprozesse (siehe 1.1.2.2 bis 1.1.2.4) in Gang gesetzt. Das dabei entstehende Narbengewebe aus Kollagenfasern kann durch klassische Färbetechniken wie der Picro-Sirius-Rot- (Abb. 3.24) oder Masson Trichrom-Färbung (Abb. 6.12) visualisiert und quantifiziert werden (Puchtler & Isler 1958; Sweat et al. 1964).

Repräsentative Picro-Sirius-Rot-gefärbte Kryoschnitte von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen sind exemplarisch in Abb. 3.24 A dargestellt. Bei der Erfassung des Fibrosierungsgrades bezogen auf das Gesamtherz zeigten CM Slack KO einen tendenziell höheren fibrotischen Anteil gegenüber den CM Slack CTR (Abb. 3.24 B) (CM Slack CTR:  $6,57 \pm 0,38$  %; CM Slack KO:  $7,39 \pm 0,37$  %). Bei der differenzierten Betrachtung einzelner Areale in Abb. 3.24 C zeichnete sich eine signifikant erhöhte Fibrosierung in Areal 1 (CM Slack CTR:  $8,13 \pm 0,56$  %; CM Slack KO:  $10,39 \pm 0,55$  %; \*  $p < 0,05$ ) und in Areal 5 (CM Slack CTR:  $6,30 \pm 0,38$  %; CM Slack KO:  $8,56 \pm 0,85$  %; \*  $p < 0,05$ ) von CM Slack KO-Hezen ab. Die weiteren Areale zeigten identisch große prozentuale Anteile an rotgefärbtem fibrotischen Gewebe zwischen beiden Genotypen.



**Abb. 3.24 Picro-Sirius-Rot-Färbung zur Untersuchung von kardialer Fibrose nach I/R<sub>4</sub>Wochen**

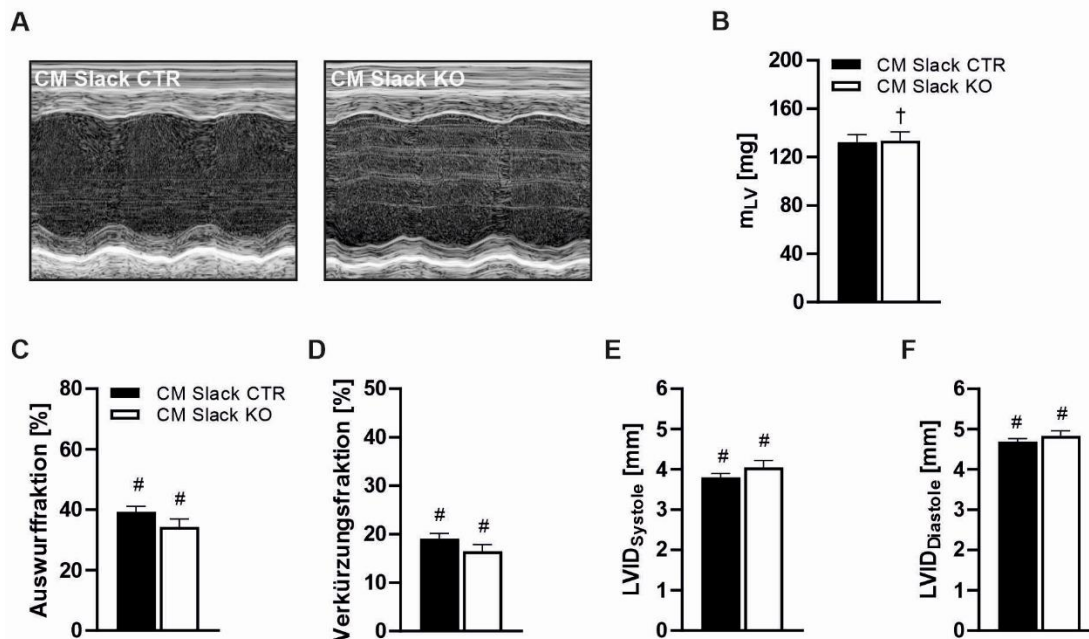
(A) Repräsentative Herzscheiben aus Areal 2 und 5 von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Visualisierung des fibrotischen Gewebes (rot) mittels Picro-Sirius-Rot-Färbung. (B) Die Quantifizierung des fibrotischen Anteils im Gesamtherz (in %) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, während die Detailanalyse (C) der fibrotischen Anteile (in %) in den Arealen 1 und 5 einen signifikant größeren Fibroseanteil im CM Slack KO ergab. Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR}}$ : 9 Herzen und  $n_{\text{CM Slack KO}}$ : 8 Herzen, \*  $p < 0,05$ .

### 3.13.3 M-Mode basierte Analyse der Herzfunktion nach I/R<sub>4</sub>Wochen

Die postischämischen Prozesse am Myokard provozieren ein ventrikuläres *remodeling*, das geprägt ist von Inflammation, zellulärer Migration und kardialer Narbenbildung. Diese strukturellen kardialen Veränderungen tragen zur Entwicklung systolischer und diastolischer Dysfunktionen bei (Rai et al. 2017).

Die Herzfunktion von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4</sub>Wochen wurde wie schon im Rahmen der physiologischen kardiovaskulären Phänotypisierung (siehe 3.8.1) zunächst mittels der konventionellen M-Mode-Methode in PSLAX (Abb. 3.25) untersucht. Anhand qualitativ hochwertiger M-Mode-Aufnahmen (Abb. 3.25 A) wurde die linksventrikuläre Myokardfunktion quantitativ erfasst. Die Schlagkraft der I/R<sub>4</sub>Wochen-konditionierten CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen (Abb. 3.25 C, D) zeigte sich im Vergleich zur physiologischen Kontraktilität (Abb. 3.16) signifikant reduziert ( $\# p < 0,001$ ). Zwischen den Genotypen ergab sich aber weder für die pathophysiologisch veränderte EF (Abb. 3.25 C) (CM Slack CTR, EF:  $39,27 \pm 1,74$  %; CM Slack KO, EF:  $34,34 \pm 2,48$  %) noch für die FS (Abb. 3.25 D) (CM Slack CTR, FS:  $19,10 \pm 0,97$  %; CM Slack KO, FS:  $16,47 \pm 1,30$  %) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Auch bei der Erfassung des minimalen LVID in der Systole (Abb. 3.25 E) bzw. des maximalen LVID in der Diastole (Abb. 3.25 F) war eine deutliche Vergrößerung infolge von I/R<sub>4</sub>Wochen zu beobachten ( $\# p < 0,001$ ).

Dabei zeigte weder der systolische LVID (CM Slack CTR:  $3,80 \pm 0,09$  mm; CM Slack KO:  $4,04 \pm 0,16$  mm) noch der diastolische LVID (CM Slack CTR:  $4,69 \pm 0,07$  mm; CM Slack KO:  $4,83 \pm 0,12$  mm) eine Slack-abhängige Veränderung nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Die  $m_{LV}$  (Abb. 3.25 B) der I/R-geschädigten Herzen war nur im CM Slack KO (im Vergleich zu den unbeschädigten Herzen) allerdings signifikant größer ( $\dagger p < 0,05$ ). Dennoch führte dies zu keinem statistisch relevanten Unterschied hinsichtlich der  $m_{LV}$  zwischen den CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4Wochen</sub> (CM Slack CTR:  $132,36 \pm 5,76$  mg; CM Slack KO:  $133,48 \pm 6,92$  mg).



**Abb. 3.25 Konventionelle M-Mode-Echokardiographie zur Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion nach I/R<sub>4Wochen</sub>**

(A) Repräsentative M-Mode-Aufnahmen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen in PSLAX-Einstellung. Beide Genotypen präsentierten eine reduzierte Auswurfraction (C) und eine reduzierte Verkürzungsfraktion (D) nach I/R<sub>4Wochen</sub> sowie eine Vergrößerung des systolischen (E) und diastolischen LVID (F) und der  $m_{LV}$  (B). Die Messungen erfolgten bei einer stabilen HF  $> 400$  bpm (Abb. 3.26 E). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{CM\ Slack\ CTR}$ : 10 Tiere und  $n_{CM\ Slack\ KO}$ : 9 Tiere gezeigt. Die statistische Analyse, bezugnehmend auf das Behandlungsregime (I/R<sub>4Wochen</sub> vs. basal), wurde wie folgt dargestellt:  $\dagger p < 0,05$ , #  $p < 0,001$ .

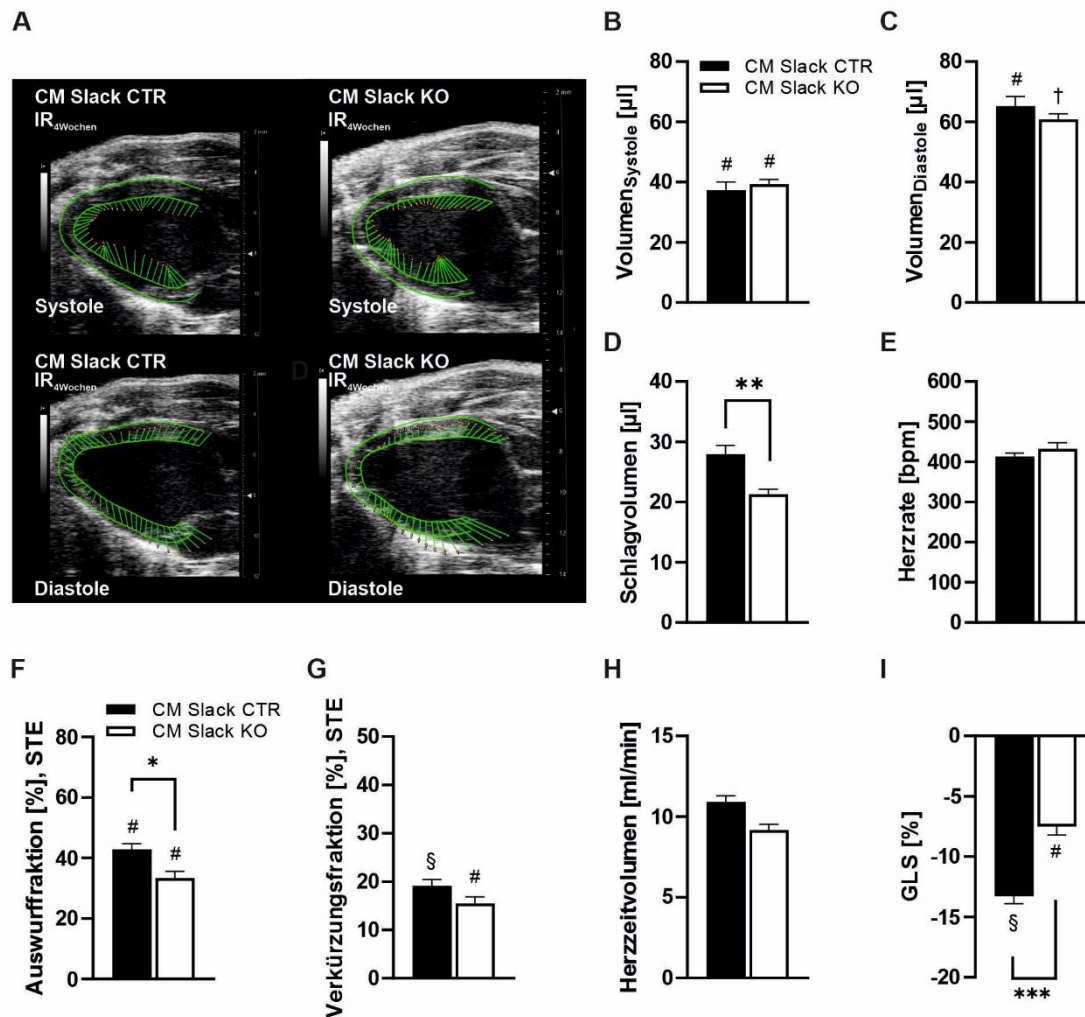
### 3.13.4 STE-basierte Analyse der Herzfunktion nach I/R<sub>4Wochen</sub>

Die Herzfunktion von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4Wochen</sub> wurde zudem mittels ST-basierter Deformationsanalyse untersucht. Anhand zweidimensionaler B-Mode-Sequenzen, aufgenommen bei einer stabilen Herzrate  $> 400$  bpm (Abb. 3.26 E) (CM Slack CTR:  $413,46 \pm 7,98$  bpm; CM Slack KO:  $432,34 \pm 14,58$  bpm), wurde zunächst die globale Herzfunktion untersucht. Die am Endokard platzierten Vektoren in den repräsentativen Graustufenbildern (Abb. 3.26 A) veranschaulichen eine pathophysiologische Veränderung des Bewegungsmusters von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Dies bestätigte sich durch die halbautomatisierte, quantitative Auswertung der GLS. In beiden Genotypen war dieser Parameter (Abb. 3.26 I) signifikant reduziert gegenüber der ursprünglichen longitudinalen Verkürzungskapazität der Herzen (Abb. 3.17) ( $\S p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ ). Im Vergleich zur CM Slack CTR zeichnete sich eine deutlich eingeschränkere

Dehnungskapazität im CM Slack KO ab (CM Slack CTR:  $-13,28 \pm 0,58 \%$ ; CM Slack KO:  $-7,50 \pm 0,68 \%$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die Betrachtung der EF (Abb. 3.26 F) sowie der FS (Abb. 3.26 G) bestätigten einen linksventrikulären Funktionsverlust nach I/R<sub>4Wochen</sub> (§  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zu der M-Mode-Analyse in Abb. 3.25 C zeigte sich ein statistisch relevantes Defizit in der EF von CM Slack KO- vs. den CM Slack CTR-Herzen. Die Deletion des kardiomyozytären Slack-Kanals führte zu einer signifikant verminderten Auswurfkapazität (CM Slack CTR:  $42,80 \pm 1,81 \%$ ; CM Slack KO:  $33,33 \pm 2,13 \%$ , \*  $p < 0,05$ ). Auch die FS zeigte sich Slack-abhängig und war entsprechend tendenziell im CM Slack KO reduziert (CM Slack CTR:  $19,15 \pm 1,25 \%$ , CM Slack KO:  $15,48 \pm 1,27 \%$ ,  $p < 0,068$ ). Die verschlechterten Funktionsparameter errechneten sich aus den erhöhten Blutvolumina während der Systole (Abb. 3.26 B) und Diastole (Abb. 3.26 C) der I/R<sub>4Wochen</sub>-konditionierten Herzen. Sowohl das EDV (CM Slack CTR:  $65,23 \pm 3,03 \mu\text{l}$ ; CM Slack KO:  $60,85 \pm 1,67 \mu\text{l}$ ) als auch das ESV (CM Slack CTR:  $37,31 \pm 2,56 \mu\text{l}$ ; CM Slack KO:  $39,30 \pm 1,48 \mu\text{l}$ ) beider Genotypen waren nach dem ischämischen Ereignis erhöht. Das daraus resultierende SV (Abb. 3.26 D) im CM Slack KO war gegenüber dem SV der CM Slack CTR signifikant reduziert (CM Slack CTR:  $27,92 \pm 1,38 \mu\text{l}$ ; CM Slack KO:  $21,30 \pm 0,79 \mu\text{l}$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Dieser statistisch signifikante Effekt wurde letztlich bei der Berechnung des CO durch Multiplikation des SV mit der HF nivelliert. Das resultierende CO (Abb. 3.26 H), das die zirkulierende Blutmenge pro min angibt, präsentierte sich in den CM Slack KO-Tieren leicht, jedoch nicht statistisch signifikant, reduziert gegenüber dem CO der CM Slack CTR-Mäuse (CM Slack CTR:  $10,91 \pm 0,35 \text{ ml/min}$ ; CM Slack KO:  $9,18 \pm 0,32 \text{ ml/min}$ ).

Im Gegensatz zur M-Mode-Analyse (siehe 3.13.3) enthüllte die STE-Analyse der I/R<sub>4Wochen</sub>-geschädigten Herzen eine myokardiale Dysfunktion mit z. T. statistisch relevanten, größeren Defiziten im CM Slack KO. Eine tabellarische Gegenüberstellung aller sonographisch-erfassten Daten ist im Anhang (siehe 6.14) einsehbar.



**Abb. 3.26** ST-basierte Echokardiographie zur Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion nach I/R<sub>4</sub>Wochen

(A) Repräsentative B-Mode-Aufnahmen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen in Systole und Diastole nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Die Vektorbewegung (grün) hebt die pathophysiologische Veränderung der Myokarddeformation hervor. Die minimalen/maximalen Volumenstände in der Systole (B) und Diastole (C) nach I/R<sub>4</sub>Wochen waren vergrößert und das Schlagvolumen (D) in CM Slack KO-Herzen gegenüber den CM Slack CTR-Herzen signifikant verschlechtert. Das Herzzeitvolumen (H) zeigte keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die weiteren funktionalen Parameter bestätigten allesamt einen Methoden-abhängigen Effekt und betonten eine verschlechterte Myokardtätigkeit nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Während die Verkürzungsfraction (G) einen Genotyp-abhängigen Effekt andeutete, zeigte sich die Auswurfraction (F) und die globale, longitudinale Deformation (GLS) (I) signifikant verschlechtert in CM Slack KO-Herzen im Vergleich zu CM Slack CTR-Herzen. Die echokardiographischen Messungen erfolgten an Isofluran-anästhesierten Mäusen bei einer stabilen HF > 400 bpm (E). Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR}}$ : 10 Tiere und  $n_{\text{CM Slack KO}}$ : 9 Tiere, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse, bezugnehmend auf das Behandlungsregime (I/R<sub>4</sub>Wochen vs. basal), wurde wie folgt dargestellt: †  $p < 0,05$ , §  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ .

### 3.13.5 STE-basierte Segmentanalyse zur Erfassung regionaler Dysfunktionen nach I/R<sub>4</sub>Wochen

Regionale Wandbewegungsstörungen entstehen oftmals als Folge einer Myokardischämie. Die STE als moderne Ultraschalltechnik berechnet neben der globalen Deformation auch das regionale Wandbewegungsmuster am Myokard. Mithilfe der sonographischen

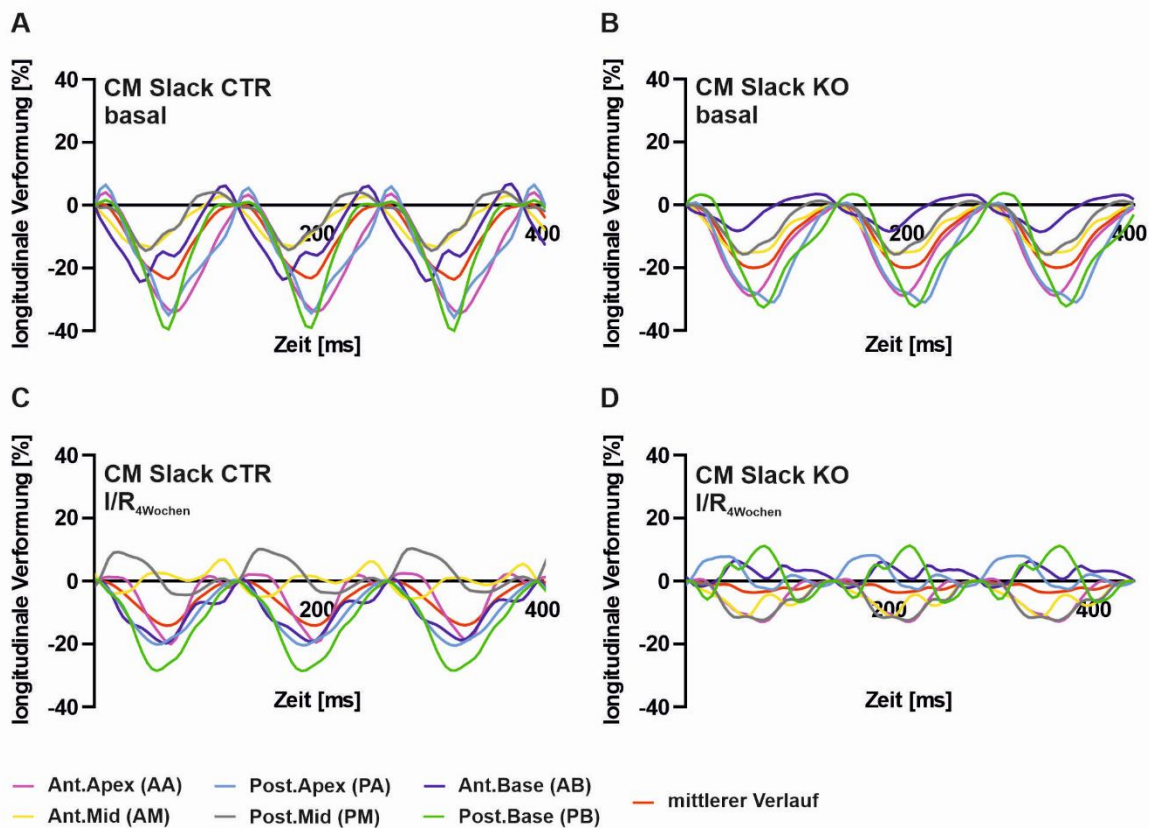
Segmentanalyse werden lokalisierte funktionale Verschlechterungen an der Herzwand identifiziert. Dadurch eignet sich diese Methode als Instrument zur Früherkennung kontraktiler Dysfunktionen und angehender chronischer Herzerkrankungen (Bauer et al. 2011; Bhan et al. 2014; Mondillo et al. 2011).

Die segmentale Deformationsanalyse (siehe 3.13.5.1 bis 3.13.5.3) erfolgte an B-Mode-Aufnahmen in PSLAX-Ausrichtung, d. h. es wurde die longitudinale und die radiale Wandbewegung untersucht. Zur Erfassung der regionalen Myokardfunktion wurden die Herzen in 6 Segmente (Abb. 2.9 A) unterteilt und mithilfe der Verformung (syn. Dehnung, *strain*), der Verformungsrate und der Verformungsgeschwindigkeit funktional analysiert. Für die Auswertung wurden CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen nach I/R<sub>4Wochen</sub> untersucht. Als Kontrolle wurden CM Slack-Mutanten ohne pathophysiologischen Stimulus (basal) sonographisch untersucht.

### 3.13.5.1 Longitudinale Verformung

Bei der Betrachtung der longitudinalen Myokarddeformation liegt der Fokus auf den endokardial angrenzenden Myokardfasern, die aufgrund ihrer Längsausrichtung zu einer Verkürzung von der Basis in Richtung der Herzspitze (Apex) führen. Das Ausmaß der Verformung (Dehnung in %) wird auf den Ausgangszustand maximaler Relaxation der Muskelfasern innerhalb eines Herzzyklus bezogen. Eine negative Prozentwert-Verschiebung impliziert somit eine Verkürzung des linken Ventrikels. Repräsentative physiologische Bewegungsmuster von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen sind in Abb. 3.27 A und B dargestellt. Die farbigen Kurvenverläufe repräsentieren die longitudinale Verformung von jeweils einer Herzregion innerhalb von drei nacheinander stattfindenden Herzzyklen. Der mittlere Verlauf aller 6 Segmente ist als rote Kurve erkennbar (Abb. 3.27). Typischerweise zeigt sich zu Beginn des Herzzyklus eine leicht positive Deformation einhergehend mit dem Verschluss der Mitralklappe. Im Zuge der isometrischen Kontraktion und Auswurfphase wird der negative Peak-Wert der systolischen Deformation erreicht. Nach dem Verschluss der Aortenklappe folgt die isometrische Relaxation und die Phase der linksventrikulären Füllung, die zu einer erneuten Abnahme (Annäherung an 0) der negativen longitudinalen Verformung führt. Unter physiologischen Bedingungen liegt der negative Peak-Wert des mittleren Bewegungsverlaufs bei  $\leq -15\%$  und die einzelnen Wandsegmente zeigen einen synchronen Verlauf, was auf die physiologische Verformung der CM Slack CTR- und CM Slack KO-Hezen (Abb. 3.27 A, B) zutrifft. Eine pathophysiologisch veränderte Wandbewegung wie z. B. nach einem MI kann sich auf unterschiedliche Weisen präsentieren. Eine Dysfunktion ist beispielsweise erkennbar, wenn die longitudinale Verformung trotz normalem Kurvenverlauf vermindert stattfindet, d. h. im Mittel  $> -15\%$  erscheint. Dieser Zustand ist Ausdruck einer reduzierten Kontraktilität des linken Ventrikels, erkennbar beispielsweise an den repräsentativen Verläufen von CM Slack CTR (Abb. 3.27 C) und CM Slack KO (Abb. 3.27 D) nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Eine abnorme Wandbewegung ist zudem ersichtlich, wenn eine positive Verformung (mit Ausnahme der Anfangsphase) innerhalb eines Herzzyklus auftritt. Dieses, als Dyskinesie bezeichnete, Phänomen ist u. a. erkennbar an den Regionen *Anterior Mid* und *Posterior Mid* des repräsentativen CM Slack CTR-Beispiels nach I/R<sub>4Wochen</sub> (Abb. 3.27 C). Dem

pathophysiologischen Erscheinungsbild ist des Weiteren das asynchrone Verhalten gegenüberliegender Wandregionen (anterior zu posterior) hinzuzufügen. Eine ausgeprägte Asynchronität ist im repräsentativen Verlauf von CM Slack KO nach I/R<sub>4Wochen</sub> in Abb. 3.27 D zu beobachten.



**Abb. 3.27 Longitudinale Verformung des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der endokardialen Deformation von CM Slack CTR- und CM Slack KO- Herzen unter Basalbedingungen (A, B) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (C, D) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die longitudinale Verformung einzelner Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in rot gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertungsstrategie generiert.

Für die statistische Analyse wurden die Peak-Werte der einzelnen Wandregionen und des mittleren Verlaufs von CM Slack CTR- und CM Slack KO- Herzen nach I/R<sub>4Wochen</sub> und unter Basalbedingungen untersucht. Dieser Wert beschreibt die maximale Verkürzungskapazität des Endokards innerhalb einer Herzschlagphase. Um eine mögliche kontraktile Dysfunktion nach Infarkt in beiden Genotypen zu untersuchen, wurden die Peak-Werte von I/R-betroffenen Herzen und gesunden Herzen gegenübergestellt. Aufgrund der definierten Position der LCA-Okklusion am Myokard wird eine regionale Verschlechterung insbesondere in den mittleren und Apex-orientierten Regionen erwartet (Bauer et al. 2011). In Abb. 3.28 A zeigte sich in beiden Genotypen ein Kontraktilitätsverlust in allen sechs Segmenten (Basis, Mitte und Apex; posterior und anterior) nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Aufgrund der dysfunktionalen Variabilität (reduzierte Kontraktilität, Dyskinesie, Asynchronität) und dem dadurch bedingten hohen Standardfehler

(SEM) wurden bei der Einzelsegmentanalyse Funktionsdefizite der longitudinalen Verformungskapazität mit nur geringer statistischer Relevanz sichtbar. Ein klareres Bild zeigte sich bei der Auswertung der mittleren longitudinalen Verformung im Rahmen der regionalen STE-Analyse. Der mittlere Peak-Wert ergibt sich aus dem mittleren Kurvenverlauf (Abb. 3.27, rote Kurve), der als Summenkurve aus allen sechs Segmenten zustande kommt. Es ist zu berücksichtigen, dass dieser Wert also nicht der Mittelwert aller Einzelsegment-Peak-Werte ist. In Abhängigkeit der abnormen/pathophysiologischen Wandbewegungsart kann der mittlere Peak-Wert daher geringer ausfallen. Im Verlauf von CM Slack KO in Abb. 3.27 D ist beispielhaft zu erkennen, dass vor allem die Asynchronität der Wandbewegungen zu einer ausgeprägten Verschlechterung der mittleren Deformationskapazität innerhalb eines Herzzyklus führt.

In Abb. 3.28 B zeigte sich zunächst unter physiologischen Basalbedingungen eine intakte, mittlere longitudinale Verformung  $< -15\%$  in den gesunden Herzen der CM Slack CTR ( $-18,14 \pm 1,20\%$ ) und CM Slack KO ( $-15,87 \pm 1,02\%$ ). Durch den pathophysiologischen Stimulus nach I/R<sub>4Wochen</sub> war die endokardiale Kontraktilität in beiden Genotypen signifikant reduziert ( $\# p < 0,001$ ). Hinzu kommt, dass die mittlere longitudinale Verkürzungskapazität nach I/R<sub>4Wochen</sub> von CM Slack KO-Herzen ( $-5,93 \pm 0,89\%$ ) deutlich stärker beeinträchtigt war als die von CM Slack CTR-Herzen ( $-12,44 \pm 0,68\%$ ) ( $*** p < 0,001$ ). Dieses Ergebnis stimmt mit der globalen Deformationsanalyse der STE überein, die ebenfalls ein größeres Defizit in der GLS von Slack-defizienten Herzen identifizierte (Abb. 3.26 I).

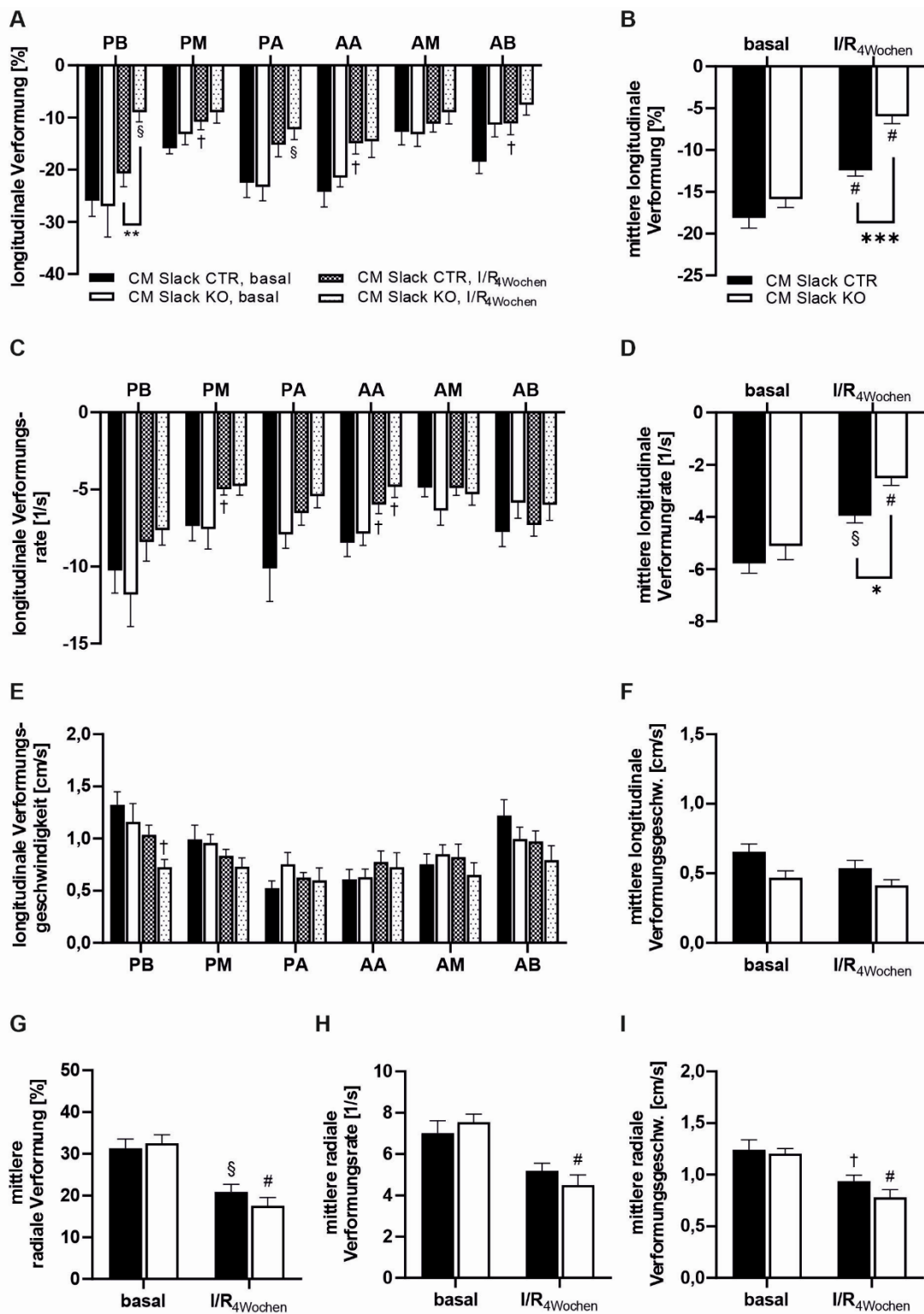


Abb. 3.28 Statistische Erfassung der regionalen Deformation in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4</sub>Wochen

STE-basierte regionale Funktionsanalyse von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen und nach I/R<sub>4Wochen</sub>. **(A)** Die longitudinale Verformungskapazität nach I/R<sub>4Wochen</sub> war in allen sechs Segmenten (PB, PM, PA, AA, AM, AB) von beiden Genotypen verschlechtert. **(B)** Darstellung der mittleren longitudinalen Verformung. Die physiologische Deformationskapazität von CM Slack CTR und CM Slack KO war nach I/R<sub>4Wochen</sub> signifikant schlechter. Dabei lag ein funktional größeres Defizit in den Slack-defizienten Herzen vor. **(C)** Differenzierte Betrachtung der longitudinalen Verformungsrate der einzelnen Wandregionen entlang des Endokards. **(D)** Die mittlere longitudinale Verformungsrate bestätigte eine Funktionsabnahme nach I/R<sub>4Wochen</sub> in beiden Genotypen. Dabei zeigten CM Slack KO-Herzen eine schlechtere Performance gegenüber den CM Slack CTR-Herzen. **(E)** Differenzierte Betrachtung der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit der einzelnen Wandregionen entlang des Endokards. **(F)** Darstellung der mittleren longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit beider Genotypen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen und nach I/R<sub>4Wochen</sub>. **(G)** Die mittlere radiale Verformung zeigte Genotyp-unabhängig eine funktionale Verschlechterung nach I/R<sub>4Wochen</sub>. **(H)** Die mittlere radiale Verformungsrate war in I/R<sub>4Wochen</sub>-konditionierten CM Slack KO-Herzen signifikant reduziert. **(I)** Die mittlere Verformungsgeschwindigkeit war erneut in beiden Genotypen signifikant verschlechtert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{CM Slack CTR, basal}}$ : 7 Tiere,  $n_{\text{CM Slack CTR, I/R 4Wochen}}$ : 10 Tiere,  $n_{\text{CM Slack KO, basal}}$ : 6 Tiere und  $n_{\text{CM Slack KO, I/R 4Wochen}}$ : 9 Tiere, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse, bezugnehmend auf das Behandlungsregime (I/R<sub>4Wochen</sub> vs. basal), wurde wie folgt dargestellt: †  $p < 0,05$ , §  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ . AA: Anterior Apex, AB: Anterior Basis, AM: Anterior Mitte, PA: Posterior Apex, PB: Posterior Basis, PM: Posterior Mitte.

### 3.13.5.2 Longitudinale Verformungsrate und -geschwindigkeit

Die STE-basierte Verformungsanalyse berücksichtigt weitere Parameter wie die myokardiale Verformung pro Zeiteinheit (Verformungsrate) und die Geschwindigkeit der *speckle*-Bewegung (Verformungsgeschwindigkeit). Bei der Betrachtung der relativen Längenänderung pro Zeiteinheit (Abb. 3.28 D) bestätigte sich eine beeinträchtigte mittlere longitudinale Verformungsrate nach I/R<sub>4Wochen</sub> in beiden Genotypen (§  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ ). Außerdem konnte eine reduzierte, relative Deformationskapazität in CM Slack KO-Herzen ( $-3,95 \pm 0,28$  1/s) gegenüber den CM Slack CTR-Herzen ( $-2,50 \pm 0,28$  1/s) beobachtet werden. Die Einzelsegmentanalyse in Abb. 3.28 C zeigte vor allem eine Beeinträchtigung der Myokardtätigkeit im vorderen Apexbereich (AA, †  $p < 0,05$ ) und eine tendenziell reduzierte Verformungsrate in der hinteren Apex- (PA) und mittleren Wandregion (PM). Trotz der offensichtlich schlechteren longitudinalen Verformungsrate in den Apexregionen (AA und PA) von CM Slack KO-Herzen gegenüber den CM Slack CTR-Herzen zeigten sich kein statistisch relevanter Genotypeneffekt im Rahmen der regionalen Segmentanalyse.

Anders als die longitudinale Verformung (Abb. 3.28 A, B) und die longitudinale Verformungsrate (Abb. 3.28 C, D) präsentierte die STE-basierte Segmentanalyse keine Unterschiede in der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit (Abb. 3.28 E, F). Weder bei der Betrachtung der einzelnen Wandregionen (Abb. 3.28 E) noch der mittleren Deformationsgeschwindigkeit (Abb. 3.28 F) zeigte sich eine wesentliche Änderung nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Auch die Deletion des kardiomyozytären Slack-Kanals hatte keine Auswirkungen auf den Parameter unter Basalbedingungen und nach I/R<sub>4Wochen</sub>.

Repräsentative Kurvenverläufe von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen beider Parameter, der longitudinalen Verformungsrate und der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit sind in den Kapiteln 6.15.1 und 6.15.2 dargestellt.

### 3.13.5.3 Radiale Verformungsdynamik

Die Kontraktion der mittleren Muskelfaserschicht führt zu einer radialen Verkürzung am Herzen. Durch diese Aktion findet eine Verdickung der Herzwand und eine Verkleinerung des Ventrikellumens statt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die endokardiale Verformung, Verformungsrate und Verformungsgeschwindigkeit im radialen Bewegungsmuster analysiert. Die basalen radialen Deformationseigenschaften von CM Slack CTR- und CM Slack KO- Herzen zeigten sich unverändert in Bezug auf die kardiomyozytäre Slack-Expression (Abb. 3.28 G - I). Erwartungsgemäß führte der ischämische Stimulus bei I/R<sub>4Wochen</sub> zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktionalität in beiden Genotypen (†  $p < 0,05$ , §  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ ). Dieses Defizit zeigte sich in CM Slack KO- Herzen auf statistisch höherem Niveau. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Zeitfaktors führte I/R nur in CM Slack KO- Herzen zu einer statistisch relevanten Verschlechterung der mittleren radialen Verformungsrate (Abb. 3.28 H). Repräsentative Kurvenverläufe und eine tabellarische Übersicht der radialen Parameter sind im Anhang (siehe 6.14, 6.15.3 - 6.15.5) dargestellt.

## 4 Diskussion

Der akute MI als Folge eines chronischen Koronarsyndroms (syn. KHK) zählt zu den hauptursächlichen Faktoren für Morbidität und Sterblichkeit (Wilkins et al. 2017). Die Prognoseaussichten von MI-Patienten konnten sich durch Optimierung der Interventionsabläufe (akut-PCI), diagnostischer Maßnahmen und komplexer Sekundärprophylaxe in der Vergangenheit deutlich verbessern. Entscheidend bei der Behandlung eines akuten MI ist die Dauer des ischämischen Zustands bis zur Einleitung der Reperfusionstherapie (Thygesen et al. 2018). Während der myokardialen Ischämie findet eine irreversible und mit der Zeit kontinuierlich zunehmende Schädigung von Herzmuskelgewebe statt. Auch die infarktlimitierende Revaskularisierung provoziert einen zusätzlichen Gewebeuntergang am Myokard. Aus diesem Grund ist es von großem klinischen Interesse, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln, die diesen bislang unumgänglichen I/R-Schaden und dessen Langzeitfolgen begrenzen (Hausenloy & Yellon 2013).

Die nekrotischen Prozesse am Herzen sind einer zytotoxischen Akkumulation von einerseits  $\text{Na}^+$ - und sekundär auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen geschuldet, die im pathophysiologischen Verlauf eines akuten MI auftritt (Abb. 1.1).  $\text{Na}^+$ -sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle, die infolge pathophysiologisch erhöhter  $[\text{Na}^+]_i$  aktiviert werden, vermögen diesem zellschädigenden Prozess entgegenzuwirken (Dryer 1994). Es besteht die Annahme, dass durch die Kanalaktivierung von  $\text{K}_{\text{Na}}$  eine Re- bzw. Hyperpolarisation via  $\text{K}^+$ -Efflux eingeleitet wird, die der Übererregbarkeit der Zelle und nekrotischer Prozesse bei Ischämie/Hypoxie entgegenwirkt (siehe 1.4.4). Die generierten Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit liefern Evidenz dafür, dass der kardiomyozytär exprimierte  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanal Slack der übermäßigen I/R-Schädigung am Myokard entgegenwirkt und damit eine essentielle Komponente kardioprotektiver Strategien sein könnte.

### 4.1 *In vitro* Charakterisierung des Slack-Kanals im Kardiomyozyt

#### 4.1.1 Expression von Slack im Herzen

Bislang wurde die kardiale Expression des Slack-Kanals in der Literatur kontrovers diskutiert. In Northern Blot-basierten mRNA-Distributionsanalysen konnte das Slack-Transkript im Herzen zunächst nicht nachgewiesen werden (Joiner et al. 1998). Weitere rT-PCR-basierte Expressionsanalysen von Yuan et al. 2003 bestätigten wiederum die Expression der Slack-mRNA im Herzen. Eine Schwäche dieser Studie ist jedoch die fehlende Gegenüberstellung zu einer entsprechenden murinen Slack KO-Kontrolle (Yuan et al. 2003). Die detektierte Bandenintensität lässt auf eine geringe Expressionsdichte von Slack im Herzen rückschließen. Diese Interpretation wird durch Veröffentlichung des murinen mRNA-Kompodiums *Tabula Muris* bestätigt (Schaum et al. 2018). Auch diese murine Transkriptomanalyse zeigt eine geringe kardiale Expression von Slack in Kardiomyozyten, Myofibroblasten und Glattmuskelzellen. Die vorliegende Arbeit validiert auf transkriptioneller Ebene die Slack-Expression in WT-Herzen unter zusätzlicher Berücksichtigung von Slack KO-Proben (Abb. 3.1 A). Durch Isolation adulter Kardiomyozyten konnte auch auf Proteinebene das Slack-Protein bei 140 kDa detektiert werden, wohingegen entsprechende Proteinbanden in den

Slack KO-Proben nicht nachweisbar waren (Abb. 3.1 B). Damit ist erstmals die Expression des Slack-Kanals im Herzen auf Proteinebene gelungen. Für diese Untersuchungen wurde der anti-Slack-Antikörper (NeuroMab clone N3/26) der UC Davis/NIH NeuroMab Facility verwendet, der in der C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne des Kanals bindet. Derselbe Antikörper wurde bereits zuvor erfolgreich für die spezifische Detektion von Slack in Gehirnschnitten und in Neuronen eingesetzt (Ehinger et al. 2021; Matt et al. 2021; Rizzi et al. 2016). Wie in Abb. 3.1 B ersichtlich, zeigte sich in der WT-Probe eine Doppelbande auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von Slack. Es lässt sich spekulieren, dass die Proteinbande mit einem Molekulargewicht  $> 140$  kDa durch posttranslationale Modifikation, beispielsweise durch N-Glykosylierung des Slack-Kanals, zustande kommen (Bhattacharjee et al. 2002).

In Kooperation mit Prof Dr. Viacheslav Nikolaev (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden weitere Slack-Expressionsanalysen am humanen Herzen durchgeführt. Western Blot-Analysen der ventrikulären Proben von Patienten ohne kardiovaskuläre Vorerkrankung (Kontrolle) oder ICM zeigten ein Bandensignal bei ca. 140 kDa, das nach Validierung des entsprechenden anti-Slack-Antikörpers (siehe oben) dem Slack-Kanal zuordenbar war (Abb. 3.1 C). Die heterogenen Expressionsstärken in den unterschiedlichen Proben zeigten sich dabei statistisch unabhängig von der pathophysiologischen Vorgeschichte der Patienten (Abb. 3.1 D). In Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.1 gezeigten Befunden ist die Expression des Slack-Transkripts in humanen Herzen und Kardiomyozyten auch in der Datenbank *the human protein atlas* basierend auf verschiedenen Omik-Technologien z. B. nach Analyse mittels RNA-Seq belegt (Karlsson et al. 2021; Uhlen et al. 2015).

#### 4.1.2 Funktionale Charakterisierung von Slack im Kardiomyozyt

Die *Patch Clamp*-Technik gilt als Goldstandard zur funktionalen Charakterisierung von Ionenkanälen und zum Nachweis ihrer Ionenselektivität, Leitfähigkeit, Spannungsabhängigkeit oder Ligandsensitivität (Jurkat-Rott & Lehmann-Horn 2004). Ein Verständnis der biophysikalischen Eigenschaften des betrachteten Ionenkanals im zugehörigen Zellsystem erleichtert außerdem die Interpretation bei Dysfunktion oder Funktionsverlust im Rahmen pathophysiologischer Ereignisse.

Die elektrophysiologischen Daten in Abb. 3.2 wurden in der *Whole-Cell*-Konfiguration erhoben, d. h. durch das kurze Anlegen eines Unterdrucks konnte ein direkter Zugang zum Zytoplasma der Kardiomyozyten geschaffen werden. Unter physiologischen Bedingungen liegt  $[Na^+]_i$  in Kardiomyozyten streng kontrolliert bei  $< 10$  mM, was v. a. durch die Tätigkeit der  $Na^+/K^+$ -ATPase sichergestellt wird (Murphy & Eisner 2009). Die hier gewählte  $Na^+$ -Konzentration in der Pipettenlösung (45 mM) entspricht in etwa dem  $EC_{50}$ -Wert aus vorangegangenen *in vitro*-Studien, d. h. die Konzentration, die für die halbmaximale Offenwahrscheinlichkeit des Slack-Kanals notwendig war (Bhattacharjee et al. 2003; Dryer 1994; Kaczmarek 2013). Überraschenderweise waren unter diesen Bedingungen keine Unterschiede des  $K^+$ -Auswärtsstroms zwischen WT- und Slack KO-Kardiomyozyten zu beobachten. Im Gegenteil zeigte sich ein tendenziell erhöhtes Strom-Spannungsverhältnis in den Slack KO-Kardiomyozyten gegenüber den WT-Kontrollzellen (Abb. 3.2 A, C). Dies führt zu der Annahme, dass Slack KO-Kardiomyozyten durch eine kompensatorisch veränderte  $K^+$ -Kanal-

Komposition gekennzeichnet sind. Die Vermutung liegt nahe, dass der paraloge  $K_{Na}$ -Kanal Slick betroffen ist, was sich allerdings per mRNA-Analyse nicht bestätigte (Abb. 6.1). qRT-PCR-basierte Expressionsanalysen von Slick in Slack KO-Herzen und Slack-defizienten kardialen Zellen (Kardiomyozyten, Fibroblasten) zeigten keine Veränderung des Slick-Expressions-musters im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Analog zu Slack besitzt auch der Slick-Kanal verschiedene Offenzustände mit variabler  $K^+$ -Leitfähigkeit (Bhattacharjee et al. 2003), die in Slack KO-Herzen verändert sein könnten. Aus diesem Grund gibt die Expressionsdichte der Ionenkanäle nur bedingt einen Rückschluss auf deren zelluläre Einflussnahme. Weitere funktionale Analysen wie z.B. die Untersuchung zusätzlicher Ionenströme (z.B.  $I_{to}$ ) in Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen sind also notwendig, um den Effekt auf das Strom-Spannungsverhältnis der Slack KO-Kardiomyozyten zu klären. In einem nächsten Experiment zeigten sich durch pharmakologische Modulation mit den  $K_{Na}$ -Inhibitoren Clofilium und Chinidin signifikante Unterschiede zwischen WT- und Slack KO-Kardiomyozyten. Entsprechend war der  $K^+$ -Auswärtsstrom Clofilium- und Chinidin-sensitiver in Slack-profizienten Zellen (Abb. 3.2 B, D). Die Antiarrhythmika sind bekannt für ihre Ionenkanal-blockierenden Eigenschaften, die bereits an verschiedenen  $K^+$ -Kanälen und spannungssensitiven Ionenkanälen in Kardiomyozyten, Neuronen und weiteren Zelltypen beobachtet wurden (Kehl 1991; Yang et al. 2005a; Yang et al. 2013). Erste Hinweise auf eine  $K_{Na}$ -Kanal-inhibierende Wirkung von Chinidin an Kardiomyozyten ergaben sich durch elektrophysiologische Messungen in der *Inside-Out*-Konfiguration an ventrikulären Zellen des Meerschweinchens (Mori et al. 1998). In weiteren Studien an CHO-Zellen konnte eine effiziente Slack- bzw. Slick-Kanalblockade (> 90 %) unter Stimulation mit 1 mM Chinidin nachgewiesen werden (Bhattacharjee et al. 2003). Untersuchungen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung an Slack-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten ergaben einen  $EC_{50}$ -Wert von ca. 100  $\mu$ M und eine spannungsunabhängige Blockade des  $K^+$ -Auswärtsstroms durch Chinidin. Zusätzlich sprechen die elektrophysiologischen Messungen an stabil-transfizierten HEK-Zellen für eine direkte inhibitorische Modulation des Slack-Kanals durch Chinidin (1 mM) (Yang et al. 2006). Eine entsprechende Hemmung von  $K_{Na}$ -Kanal-abhängigen Strömen wurde auch für das Antiarrhythmikum Clofilium berichtet (de Los Angeles Tejada et al. 2012). Vergleichende Untersuchungen an  $K_{Na}$ -Kanal-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten veranschaulichten eine ausgeprägtere  $K^+$ -Stromabnahme für Slack (- 75  $\pm$  1 %) gegenüber Slick (- 51  $\pm$  3 %) nach Exposition mit Clofilium (100  $\mu$ M).

Durch die Verwendung von Chinidin und Clofilium ist also ein inhibitorischer Effekt auf beide  $K_{Na}$ -Kanäle Slack und Slick zu erwarten. Wie in Abb. 3.2 ersichtlich, war der  $K^+$ -Stromfluss infolge der pharmakologischen Stimulation in beiden Genotypen reduziert. In den WT-Zellen zeigte sich eine deutlich stärkere Veränderung der Strom-Spannungskurve (Abb. 3.2 A, C) als in Slack KO-Kardiomyozyten. Der signifikant größere Anteil Antiarrhythmika-sensitiver  $K^+$ -Ströme bei +60 mV in WT-Zellen (Abb. 3.2 B und D) validiert die funktionale Expression von Slack in Kardiomyozyten. Die beobachteten Effekte in Slack KO-Kardiomyozyten sind vermutlich auf die nicht-selektiven, Ionenkanal-modulierenden Eigenschaften der Pharmaka, insbesondere auf den Slick-vermittelten  $K^+$ -Strom zurückzuführen. Nach Berücksichtigung einer entsprechenden Stromkomponente in WT-Kardiomyozyten lässt sich schlussfolgern, dass ca. zwei Drittel des Pharmaka-vermittelten  $K^+$ -Auswärtsstroms durch Slack reguliert wird.

Unter den gegebenen Messbedingungen bei +60 mV und 45 mM  $[Na^+]_i$  scheint somit die Slack-Kanal-Aktivität im Kardiomyozyt der Slick- $K^+$ -Leitfähigkeit „überlegen“ zu sein.

Bei den hier diskutierten Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass das pharmakologische Profil von Slack und Slick nahezu identisch ist (de Los Angeles Tejada et al. 2012; Yang et al. 2006). Daher ist der direkte Nachweis der  $Na^+$ -abhängigen Aktivierbarkeit des Slack-Kanals im Kardiomyozyt ein noch ausstehendes Schlüsselexperiment im Zuge der *in vitro* Charakterisierung. Eine gezielte Manipulation von  $[Na^+]_i$  gelingt beispielsweise durch graduelle Anpassung der Dialyse-Lösung im vorliegenden experimentellen Setup. Bei steigender  $Na^+$ -Konzentration ist eine frühe Zunahme des  $K^+$ -Auswärtsstroms in WT-Kardiomyozyten zu erwarten. Dieser Effekt sollte aufgrund der Slack-Deletion und der biophysikalischen Eigenschaften des Slick-Kanals verzögert bzw. in reduzierter Stromstärke in Slack KO-Kardiomyozyten zu beobachten sein (Bhattacharjee et al. 2003). Alternativ sollte durch Verwendung des  $Na_v$ -Inhibitors Tetrodotoxin (TTX) ein erhöhter TTX-sensitiver  $K^+$ -Strom durch stärkere  $K^+$ -Stromabnahme im WT messbar sein (Ehinger et al. 2021).

Alternativ ist auch der Einsatz spezifischer Slack-Modulatoren zur Charakterisierung der  $K_{Na}$ -vermittelten  $K^+$ -Ionenströme in Herzmuskelzellen denkbar. Durch den hohen Behandlungsbedarf verschiedener und z. T. nahezu pharmakoresistenter Epilepsieformen, die im Zusammenhang mit Slack-assoziierten *gain-of-function*-Mutationen beobachtet wurden (siehe 1.4.3), ist speziell die Entwicklung von Slack-selektiven Inhibitoren klinisch hochrelevant (Cole et al. 2020; Mullen et al. 2018). Die niedermolekulare Verbindung VU0606170 wurde beispielsweise als selektiver Slack-Inhibitor identifiziert, wurde aber bisher nur in kortikalen Neuronenkulturen getestet (Spitznagel et al. 2020).

#### 4.1.3 Slack moduliert die $K^+$ -Dynamik im Kardiomyozyt

Die Aufrechterhaltung der  $K^+$ -Homöostase am Herzen ist von entscheidender Wichtigkeit für den Erhalt der physiologischen Reizweiterleitung und der Pumpleistung des kontraktiven Arbeitsmyokards (Grant 2009; Palmer & Clegg 2016). An diesem Prozess sind neben der  $Na^+/K^+$ -ATPase eine Vielzahl zellulärer  $K^+$ -Transportsysteme beteiligt (Kjeldsen 2003). Um die Frage zu adressieren, ob auch der kardiale Slack-Kanal an der extra- und intrazellulären  $K^+$ -Dynamik am Kardiomyozyt involviert ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit FRET-basierte  $K^+$ -Messungen mittels der  $K^+$ -Biosensoren GEPII 1.0 (Bischof et al. 2017) durchgeführt. Die Funktionalität der Sensoren wurde bereits in Kulturen von Zelllinien (Bischof et al. 2021) und in murinen Primärzellen (Ehinger et al. 2021) nachgewiesen. So wurde in unserer Arbeitsgruppe bereit die virale Transduktion mit dem zytoplasmatischen Sensor NES I $\alpha$ -LysM GEPII 1.0 an kultivierten zerebellären Granularzellen (CGCs) von WT- und Slack KO-Mäusen durchgeführt. Im Rahmen von NMDA-induzierten Exzitotoxizitätsstudien enthüllte das GEPII-basierte *live-cell K<sup>+</sup>-imaging* einen Genotyp-abhängigen, signifikanten Unterschied, der sich als verstärkter  $K^+$ -Efflux in WT- gegenüber den Slack KO-CGCs manifestierte. Ehinger et al. postulierten daher eine Aktivierung des Slack-Kanals infolge eines NMDAR-abhängigen  $Na^+$ -Influx bei NMDA-Überstimulation und infolgedessen eine, durch den  $K^+$ -Efflux bedingte, Hyperpolarisation der Zelle, was wiederum die exzitotoxischen Prozesse limitiert. Die  $K^+$ -

Messergebnisse bestärken die Annahme einer zellprotektiven Bedeutung des Slack-Kanals bei exzitotoxischen Prozessen in CGCs (Ehinger et al. 2021).

Die virale Transduktion und Expression von NES Ic-LysM GEPII 1.0 konnte auch an kultivierten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 3.4 A, B). Um den Slack-Kanal pharmakologisch zu adressieren, wurden die beiden Aktivatoren Niclosamid und Bithionol verwendet. Auch dieser experimentelle Ansatz verfolgte das Ziel, die funktionale Expression des Slack-Kanals am Kardiomyozyt zu validieren. Da unter den für diesen experimentellen Aufbau vorliegenden physiologischen Versuchsbedingungen (siehe 2.9.5) eine nur geringe Slack-Aktivität im Kardiomyozyt zu erwarten war (Kaczmarek 2013), sollte die pharmakologische Aktivierung mittels Niclosamid und Bithionol einen gezielten  $K^+$ -Efflux v. a. in den WT-Zellen auslösen. Bithionol zählt zu den ersten pharmakologischen Substanzen, für die eine  $K_{Na}$ -Kanal-aktivierende Wirkung nachgewiesen wurde (Kaczmarek 2013). Eine Bithionol-abhängige Zunahme der  $K_{Na}$ -Ströme wurde für Slack-exprimierenden Oozyten (Yang et al. 2006) und Neuronen des auditorischen Hirnstamms (Yang et al. 2007) gezeigt. Neben Slack und Slick wird auch der BK-Kanal durch den nicht-selektiven Wirkstoff aktiviert. Die  $K_{Na}$ -modulierenden Eigenschaften des zweiten Pharmakons Niclosamid konnten erstmals mittels Rubidium ( $Rb^+$ )-Efflux-Messungen identifiziert werden (Biton et al. 2012). *Patch Clamp*-Experimente an hSlack-exprimierenden CHO-Zellen bestätigten unter Stimulation mit 10  $\mu$ M Niclosamid eine ca. vierfache Erhöhung der Slack-abhängigen  $K^+$ -Amplitude. Auch bei der Niclosamid-Anwendung an murinen Kardiomyozyten zeigte sich eine signifikant stärkere  $[K^+]_i$ -Reduktion in WT-Myozyten gegenüber den Slack-defizienten Zellen (Abb. 3.4 C, D). Diese Beobachtungen werden durch die Untersuchungen zur  $[K^+]_{ex}$ -Dynamik in WT- und Slack KO-Zellsuspensionen nach pharmakologischer Stimulation ergänzt (Abb. 3.3). Neben Niclosamid führt auch Bithionol zu einer signifikant erhöhten  $K^+$ -Akkumulation im extrazellulären Milieu von Slack-kompetenten Kardiomyozyten (Abb. 3.3 B).  $K^+$ -repräsentierende  $TI^+$ -Flussmessungen an kultivierten WT-Kardiomyozyten bestätigten einen prominenten  $K^+$ -Efflux nach Bithionol-Stimulation (Wojtovich et al. 2016). In derselben Studie wurde das Verhalten des  $K_{Na}$ -Kanals Slick untersucht, wobei eine Slick-Deletion ebenfalls zu einem reduzierten  $K^+$ -Membranfluss in Slick KO-Kardiomyozyten führte. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Limitation der hier vorliegenden *in vitro* Untersuchungen, da aufgrund des breiten Wirkspektrums der Aktivatoren (Chen et al. 2018b; Enzie & Colglazier 1960) keine selektive Slack-Aktivierung am Kardiomyozyt möglich war. Die in Abb. 3.3 B und Abb. 3.4 D gezeigten zusätzlichen Effekte in Slack KO-Zellen sind aller Voraussicht nach durch die nicht-selektiven Ionenkanal-modulierenden Eigenschaften der Slack-Aktivatoren wie z.B. durch die Aktivierung von Slick-Kanälen zu erklären. Zusammenfassend weisen auch die FRET-basierten  $[K^+]_{ex}$ - und  $[K^+]_i$ -Messungen unter Verwendung der GEPIIs nur indirekt auf eine Slack-abhängige  $K^+$ -Dynamik am Kardiomyozyten hin.

## 4.2 Verwendung der HEK293-hKCNT1-Zelllinie als Surrogatsystem zur Untersuchung des Slack-Kanals

Die gezielte Beobachtung von Ionenkanälen durch Überexpression im heterologen System ist eine gängige Herangehensweise für die Charakterisierung der Kanaleigenschaften (Mathie et al. 2021). Dies ist im Hinblick auf den Slack-Kanal, insbesondere aufgrund der fehlenden selektiven Slack-Modulatoren (de Los Angeles Tejada et al. 2012), von besonderer Bedeutung. Slack-exprimierende HEK293-Zellen wurden beispielsweise für Untersuchungen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von Niclosamid und Loxapin (Biton et al. 2012) oder für Co-IP-Experimente von Slack/Slick-Heteromeren (Chen et al. 2009) eingesetzt. Eine Vielzahl weiterer funktionaler Studien von  $K_{Na}$ -Kanälen erfolgte zudem an CHO-Zellen oder *Xenopus* Oozyten (Bhattacharjee et al. 2003; Chen et al. 2009; Kaczmarek 2013; Yuan et al. 2003). Hierbei gilt es generell zu berücksichtigen, dass immortalisierte Zelllinien wie HEK293-Zellen ein artefizielles System darstellen, das nur bedingt die biochemischen Prozesse der isolierten Primärzelle *in vitro* bzw. eines Zellverbunds *in vivo* widerspiegeln (Kaur & Dufour 2012; Thomas & Smart 2005). Eine Annäherung an den kardiomyozytären Zelltypus könnte in zukünftigen Experimenten durch den Einsatz humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPS), die zu Kardiomyozyten (hiPS-CMs) differenziert wurden, ermöglicht werden (Matsa et al. 2016; Zhang et al. 2015). Der Phänotyp von hiPS-CMs weist vergleichbare Eigenschaften zu adulten Kardiomyozyten hinsichtlich der myozytären Genexpression, der Ionenkanal-Ausstattung, der Kontraktilität und  $Ca^{2+}$ -Dynamik, der metabolischen Aktivität und der pharmakologischen Zellantwort auf (Ivashchenko et al. 2013). Durch die Generierung einer Slack KO-hiPS-CM-Zelllinie könnten die Auswirkung der Slack-Deletion auf die Funktionalität der Kardiomyozyten, insbesondere unter ischämischen/hypoxischen Bedingungen, robust analysiert werden.

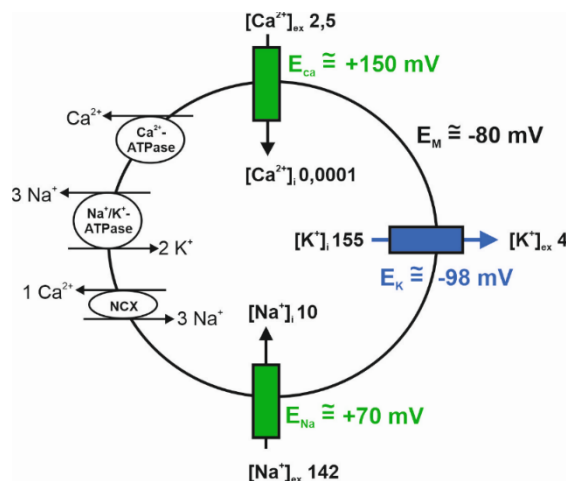
### 4.2.1 Die Überexpression von Slack in HEK293-hKCNT1-Zellen moduliert die physiologische $K^+$ -Homöostase

Ausgehend von der Annahme, dass alle Zellen des gleichen Zelltyps eine identische  $[K^+]_i$  besitzen (Palmer 2015) erfolgte anhand von GEPII-basierten  $K^+$ -Messungen unter vollständiger Permeabilisierung der Zellmembran die Berechnung des absoluten  $K^+$ -Gehalts in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen (Formel 3.1). In Abhängigkeit der Slack-Überexpression zeigte sich eine geringere  $[K^+]_i$  in HEK293-hKCNT1-Zellen gegenüber den Slack-defizienten Kontrollzellen (Abb. 3.6 C). Die ermittelten Ergebnisse via Formel 3.1 lassen auf einen konstitutiv aktiven Slack-Kanal in HEK293-hKCNT1-Zellen rückschließen, der einen permanenten  $K^+$ -Auswärtsstrom bewirkt (Zhang et al. 2005). Auch vorangegangene elektrophysiologische Studien berichten von einer milden Slack-abhängigen  $K^+$ -Leitfähigkeit von 25 - 65 pS in physiologischer Lösung bei heterologer Slack-Expression in Säuger-Zelllinien oder *Xenopus* Oozyten (Joiner et al. 1998). In Übereinstimmung dazu waren auch in den Folgeexperimenten, beispielhaft in Abb. 3.7 C dargestellt, die absoluten FRET Ratio-Werte zwischen HEK293-hKCNT1 und HEK293 signifikant verschieden. Stellvertretend für

den Grund-K<sup>+</sup>-Gehalt der Zelle lagen die basalen FRET Ratio-Werte der HEK293-hKCNT1 unterhalb den Werten der HEK293-Kontrollzellen.

Die Überexpression des Slack-Kanals in HEK293-hKCNT1-Zellen (Abb. 3.5) und die daraus resultierende veränderte K<sup>+</sup>-Ionenverteilung (Abb. 3.6 C) lässt auch eine Verschiebung des elektrochemischen Gleichgewichts der Zelle vermuten, welches durch das Gleichgewichtspotential ungleich verteilter Ionen ( $[x]_i \neq [x]_{ex}$ ), vorrangig K<sup>+</sup>, bestimmt wird (Chrysaftides et al. 2021). Entsprechend durchgeführte DIBAC4(3)-Fluoreszenzmessungen an HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen bestätigen diese Annahme (Abb. 3.9 C). So lag das Membranpotential in HEK293-hKCNT1-Zellen weniger polarisiert (weniger negativ) vor als in den Kontrollzellen. Dieser, im ersten Augenblick kontrovers erscheinende Zusammenhang zwischen dem reduzierten intrazellulären K<sup>+</sup>-Gehalt (Abb. 3.6 D) und der positiven Potentialverschiebung (Abb. 3.9 C) in Slack-exprimierenden HEK293-hKCNT1-Zellen lässt sich unter Berücksichtigung der Nernst-Gleichung (Formel 6.1) und des K<sup>+</sup>-Gleichgewichtspotentials (*equilibration potential*) schlüssig nachvollziehen (siehe 6.6).

Aufgrund der hohen K<sup>+</sup>-Permeabilität liegt das physiologische K<sup>+</sup>-Gleichgewichtspotential bei ca. -96 mV (Abb. 4.1) und ist dem Ruhemembranpotential von ca. -80 mV gegenüber den Gleichgewichtspotentialen von Ca<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> am nächsten (Chrysaftides et al. 2021; Veech et al. 1995). Berechnet wird das Membranpotential i.d.R. über die Goldman-Gleichung (oder Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung) unter Berücksichtigung aller permeierenden Ionen, d. h. der jeweilige Ionendistribution ( $[x]_i$  vs.  $[x]_{ex}$ ) und der Leitfähigkeit. (Clay 2009; Goldman 1943; Hodgkin & Katz 1949). Im Vergleich zur Nernst-Gleichung, die von einer idealen Ionenverteilung ausgeht, berücksichtigt die modifizierte Goldmann-Gleichung eine endliche Permeabilität der Ionen, das einer physiologisch realeren Zellsituation entspricht (Wright 2004).



**Abb. 4.1 Das elektrochemische Gleichgewicht einer Zelle**

Schematische Darstellung wichtiger Ionentransportsysteme, die u. a. das elektrochemische Gleichgewicht der Zelle ( $E_M$ ) von ca. -80 mV gestalten. Die transmembranäre Ionenverteilung ( $[x]_i$  und  $[x]_{ex}$  (in mM)) definiert das jeweilige Nernst-Potential ( $E_x$ ) der verschiedenen Ionenkanäle ( $E_K$ : -98 mV,  $E_{Na}$ : +70 mV,  $E_{Ca}$ : +150 mV). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt ein passiver K<sup>+</sup>-Efflux (blau) bzw. ein Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Influx (grün). Angaben nach (Ackerman & Clapham 1997).

Durch die Manipulation der transmembranären K<sup>+</sup>-Ionenverteilung, wie z. B. durch die [K<sup>+</sup>]-Reduktion infolge der Slack-Expression in HEK29-hKCNT1-Zellen (Abb. 3.6 C und Abb.

3.7 C), wird der chemische Gradient und konsequenterweise auch der elektrische Gradient gesenkt (Wright 2004). Es resultiert ein weniger negatives Nernstpotential für  $K^+$  (Abb. 4.1), was eine positive Verschiebung des elektrochemischen Gleichgewichts der Gesamtzelle bewirkt (Abb. 3.9 C).

Die  $[K^+]_i$ -Verschiebung infolge der Slack-Expression in HEK293-hKCNT1-Zellen lässt auch eine veränderte transmembranäre  $K^+$ -Leitfähigkeit vermuten. Ein direkter Nachweis z. B. durch elektrophysiologische Messungen an HEK293-hKCNT1-Zellen steht jedoch noch aus, um die Einflussnahme dieses Parameters auf das Membranpotential zu bewerten. Außerdem beruht die vorliegende Interpretation auf der Annahme, dass die Slack-Überexpression keine nennenswerte Veränderung des  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Haushalts oder der Tätigkeit der elektrogenen Enzyme zur Folge hatte. Auch hier bedarf es weiterer experimenteller Analysen um den diskutierten Zusammenhang zwischen der reduzierten  $[K^+]_i$  und dem weniger negativem Membranpotential in HEK293-hKCNT1-Zellen zu untersuchen.

Zusammenfassend deuten die bisherigen in HEK293-Zellen erhobenen Ergebnisse auf einen dauerhaft aktiven Slack-Kanal hin, der eine Verschiebung der zellulären  $K^+$ -Homöostase unter physiologischen Bedingungen provoziert. Dies könnte wiederum durch Senkung des  $K^+$ -Nernstpotentials einen Einfluss auf das elektrochemische Gleichgewicht der Zelle nehmen. Lässt sich eine solche positive Verschiebung des Membranpotentials als Resultat der physiologischen Slack-Aktivität bestätigen, ist eine erhöhte Vulnerabilität unter pathophysiologischen Bedingungen wahrscheinlich, z. B. durch Senkung der Reizschwelle. Auch an dieser Stelle sind weitere experimentelle Untersuchungen an HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen unter pathophysiologischen Bedingungen wie z. B. Hypoxie notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde alternativ auch Digitonin zur Permeabilisierung der Zellmembran eingesetzt. Die in der Folge durchgeführten  $[K^+]_{ex}$ -Messungen an isolierten WT- und Slack KO-Kardiomyozyten geben einen indirekten Hinweis auf den relativen  $K^+$ -Gehalt in den murinen Primärzellen (Abb. 3.3 A). Im Gegensatz zu den  $K^+$ -Sensor-basierten Experimenten an HEK293-hKCNT1 und HEK293 zur Erfassung der  $[K^+]_i$ , lassen die GEPII 1.0-vermittelten  $[K^+]_{ex}$ -Fluoreszenzmessungen in WT- und Slack KO-Kardiomyozyten auf einen höheren intrazellulären  $K^+$ -Gehalt in Slack-positiven Primärzellen rückschließen. Dieses Beispiel demonstriert, dass die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse im heterologen System auf eine (patho-)/physiologische Situation im ursprünglichen Organismus durchaus kritisch zu sehen ist (Kaur & Dufour 2012).

#### 4.2.2 Pharmakologische Aktivierung von Slack in HEK293-hKCNT1

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der *Slo*-Genfamilie besitzt der Slack-Kanal keinen Spannungssensor in der S4-Domäne (Salkoff et al. 2006) und die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals wird nur in geringem Maß durch depolarisierende Prozesse an der Membran stimuliert (Kaczmarek 2013). Hingegen zeichnet sich der Slack-Kanal durch seine  $Na^+$ -abhängige Aktivierbarkeit aus (Yuan et al. 2003), welche über die  $Na^+$ -Sensitivität der RCK2-Domäne vermittelt wird (Zhang et al. 2010). Dieser Aktivierungsmechanismus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit dem  $Na^+$ -Ionophor Monensin simuliert (Abb. 3.7 A, B). Die

pharmakologisch provozierte  $[\text{Na}^+]_i$ -Akkumulation führte zu einem deutlichen  $\text{K}^+$ -Efflux in HEK293-hKCNT1-Zellen, während die Monensin-induzierte  $\text{K}^+$ -Dynamik in den Slack-defizienten HEK-Zellen signifikant geringer ausfiel. In ähnlicher Weise konnte Monensin bzw. die Monensin-vermittelte  $[\text{Na}^+]_i$ -Akkumulation auch zum Nachweis der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Tätigkeit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in isolierten Glattmuskelzellen aus der Rattenaorta eingesetzt werden (Brock & Smith 1982). Wie bereits in Kapitel 4.1.2 diskutiert, ist der zusätzliche direkte Nachweis der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Aktivierbarkeit des Slack-Kanals mittels elektrophysiologischer Messungen zukünftig noch ausstehend (Yuan et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Slack-Kanal alternativ durch den Slack-Aktivator Niclosamid pharmakologisch direkt adressiert (Abb. 3.8). Infolge der Niclosamid-Applikation zeigte sich in beiden HEK293-hKCNT1 und HEK293 ein  $\text{K}^+$ -Efflux, der in den Slack-exprimierenden Zellen signifikant größer ausfiel (Abb. 3.8 B). Erwartungsgemäß provozierte die dadurch bedingte veränderte  $\text{K}^+$ -Distribution und  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit eine Anpassung des elektrochemischen Gleichgewichts der Zellen (Abb. 4.1). In Übereinstimmung hiermit führte die pharmakologische Aktivierung via Niclosamid zu einer stärkeren Depolarisation der Zellmembran Slack-positiver HEK293-hKCNT1 Zellen (Abb. 3.9). Anhand dieser *in vitro* Messungen wird deutlich, dass der Slack-Kanal einen wesentlichen Beitrag zur Gestaltung der transzellulären  $\text{K}^+$ -Dynamik und Modulation des Membranpotentials leistet.

Erneut wird das nicht-selektive Wirkprofil von Niclosamid (Biton et al. 2012) deutlich, da Slack-unabhängige Effekte sowohl bei Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Niclosamid (Daten nicht gezeigt, generiert im Rahmen der Bachelorarbeit von Sophia Schanz) als auch bei der Anwendung einer  $1 \mu\text{M}$ -Dosierung (Abb. 3.8) zu beobachten waren. Der Niclosamid-vermittelte  $\text{K}^+$ -Efflux an Slack-defizienten HEK293-Kontrollzellen scheint durch zahlreiche *off-target* Effekte zustande zu kommen. Aufgrund solcher pleiotropen Effekte konnte das ursprünglich als Molluskizid Bayluscride<sup>®</sup> (Andrews et al. 1982) und Anthelminthikum Yomesan<sup>®</sup> (Pearson & Hewlett 1985) eingesetzte Niclosamid in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewinnen. Es wird beispielsweise bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II und Tumorerkrankungen, bakteriellen und viralen Infektionen diskutiert (Chen et al. 2018b). Nicht zuletzt wurde Niclosamid (in Kombination mit Camostat) in der klinischen Studie NICCAM (NCT045750759) der Charité Research Organisation GmbH in Kooperation mit dem Pharmaunternehmen Bayer auf ein mögliches therapeutisches Nutzen bei COVID19-Patienten getestet. Zum pharmakologischen Wirkspektrum von Niclosamid zählen z. B. die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und die Modulation intrazellulärer Signalwege (z. B. mTORC1, STAT3, NF- $\kappa$ B) (Fonseca et al. 2012; Li et al. 2017; Wieland et al. 2013). Eine Störung der Ionenhomöostase durch Verschiebung des pH-Haushalts und Azidifizierung der Zelle (Fitz et al. 1989) könnte ursächlich für den Slack-unabhängigen  $\text{K}^+$ -Efflux in HEK293-Kontrollzellen sein. Letztlich betonen diese Ergebnisse erneut den Bedarf an selektiven Slack-Modulatoren für die  $\text{K}_{\text{Na}}$ -basierte Grundlagenforschung und für klinische Anwendungen (de Los Angeles Tejada et al. 2012; Spitznagel et al. 2020).

Generell sind die im HEK-Zellsystem untersuchten Zusammenhänge zwischen Slack-Status und Modulation von der pathophysiologischen Bedeutung des Kanals (z. B. bei Hypoxie/Ischämie) abzugrenzen. Hier gilt eine temporäre Veränderung des Offenzustands von

Slack als Antwort auf zelltoxische Trigger, die in eine übermäßige  $[Na^+]_i$ -Akkumulation münden (Dryer 1994). Unter diesen Bedingungen besteht die Annahme, dass der  $K^+$ -Efflux via Slack eine Re- und Hyperpolarisation der Plasmamembran bewirkt. Diese Hypothese wird in Abschnitt 4.3 anhand der Ergebnisse von H/R *in vitro* und I/R *in vivo* eingehend diskutiert. Die in diesem Abschnitt 4.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von Slack in HEK293-hKCNT1 zu einer Verschiebung der physiologischen  $K^+$ -Homöostase und positiven Verschiebung des Membranpotentials führt. Es ist zu vermuten, dass ein pathophysiologischer Stimulus zu einer übermäßigen Vulnerabilität z.B. durch Herabsetzung der Reizschwelle führen könnte. Weitere Versuche beispielsweise unter hypoxischen Bedingungen an HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen sind zur Klärung dieses Postulats notwendig. Bestätigt sich diese Annahme, dann sprechen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten dafür, dass eine Slack-Aktivität unter pathophysiologischen Bedingungen, nicht aber unter physiologischen Bedingungen, einen Vorteil für die (kardiale) Zellintegrität bergen könnte.

### 4.3 Pathophysiologische Funktion von Slack bei Ischämie/Hypoxie

#### 4.3.1 Erhöhte Zelltodrate in Slack-defizienten Kardiomyozyten bei Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro*

Um ein ischämisches Ereignis *in vitro* zu simulieren, wurden isolierte Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Mäusen unter Substratdeprivation hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie-basierte Untersuchungen an isolierten Herzen von Ratten bestätigten eine Störung des  $[Na^+]_i$ -Haushalts bei Ischämie und eine unmittelbar eintretende  $Na^+$ -Akkumulation (Pike et al. 1993; van Echteld et al. 1991). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass bereits nach 30 min  $[Na^+]_i$  ca. 30 mM betrug. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die veränderte Funktion des NHE und der  $Na^+/K^+$ -ATPase mit negativen Folgen auf die Erregungsleitung, den weiteren Ionenhaushalt und das Zellvolumen (Fuller et al. 2003). Die Erfassung der Zelltodrate in WT- und Slack-defizienten Kardiomyozyten nach H/R *in vitro* (Abb. 3.10) sollte die Hinweise auf eine mögliche protektive Aktion des Slack-Kanals validieren. Basierend auf der Annahme, dass die zytotoxische  $Na^+$ -Akkumulation eine Zunahme der Slack-Offenwahrscheinlichkeit bewirkt, konnte entsprechend eine erhöhte Vulnerabilität in Slack KO-Kardiomyozyten nach H/R bestätigt werden (Abb. 3.10 B). Zuvor wurde ein hypersensitives Verhalten gegenüber Hypoxie nur in Slo2-Mutanten der Spezies *C.elegans* berichtet (Yuan et al. 2003). Nach einer 16-stündigen Inkubationszeit in einer Hypoxiekammer starben signifikant mehr Nematoden, die einen Defekt des Slo2-Gens aufwiesen ( $86 \pm 2$  % der Slo2-Mutanten vs.  $58 \pm 2$  % der WT). Die Deletion des Slack-Kanals in murinen Slack KO-Kardiomyozyten zeigte nun eine signifikant höhere Zelltodrate nach 4 h Hypoxie und 17 h Reoxygenierung gegenüber den WT-Kontrollzellen (Abb. 3.10 B).

Bislang ungeklärt ist der zelluläre Mechanismus, der zu dem beobachteten, verstärkten Zelluntergang in Slack KO-Kardiomyozyten führte. Die Art des Zelltods ist relevant für die Einschätzung der Langzeitfolgen, da nekrotische Prozesse im Vergleich zur Apoptose eine Aktivierung des Immunsystems und Entzündungsprozesse stimulieren (Lodrin & Goumans 2021). In einem ähnlichen H/R-Modell *in vitro* mit 6 h Hypoxie und 18 h Reoxygenierung an

isolierten Kardiomyozyten der Ratte wurden beispielsweise hauptsächlich apoptotische Prozesse (Cytochrom C-Freisetzung, Caspase-3/-9-Aktivität) verantwortlich für den Zelltod gemacht (Kang et al. 2000). Da die hier durchgeführte Trypanblau-Färbung (Abb. 3.10 A) ein unspezifischer Nachweis der Zelltodrate ist, sind weitere mechanistische Untersuchungen z. B. durch LDH (Laktatdehydrogenase)-Messungen oder TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Färbungen zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nötig (Chan et al. 2013; Frankenreiter et al. 2017). Außerdem spiegelt H/R *in vitro* nur bedingt das komplexe Zusammenspiel eines ischämischen Ereignisses im Organismus wider (Portal et al. 2013). Die Bedeutung des Slack-Kanals bei Ischämie *in vivo* wurde daher im akuten MI-Modell untersucht.

#### **4.3.2 Erhöhte Vulnerabilität in globalen Slack KO-Mäusen nach Ischämie und Reperfusion *in vivo***

Eine Vielzahl verschiedener MI-Modelle an der Maus sind publiziert, die durch Okklusion der LCA eine Myokardschädigung provozieren. Es existiert dabei eine große Variabilität hinsichtlich der Okklusions- und Reperfusionsdauer, der Größe des Risikoareals, der Überlebensrate oder des Schweregrads der Schädigung (De Villiers & Riley 2020). Die technische Heterogenität der I/R-Modelle fordert ein großes Maß an experimenteller Erfahrung der durchführenden Person. Aus diesem Grund wird stets das Ligatur-betroffene Risikoareal am Myokard berechnet, das als Kontrollfaktor für die Reproduzierbarkeit der Methode steht. Wie in allen *in vivo* Kohorten des akuten MI-Modells in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt (Abb. 3.11 ff.), bestätigte sich eine stabile Arealgröße von 55 - 70 %. Dieser technische Parameter ist deckungsgleich zu den bereits publizierten Größen bei gleicher Durchführung des I/R-Modells (Bork et al. 2021; Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018; Methner et al. 2013).

In Übereinstimmung mit der beobachteten Vulnerabilität in Slack KO-Kardiomyozyten bei H/R *in vitro* (Abb. 3.10) zeichnete sich auch unter basalen Infarktbedingungen *in vivo* eine größere Vulnerabilität der Slack KO-Mäusen ab (Abb. 3.11 B). Interessanterweise war eine erhöhte Infarktgröße ausschließlich in männlichen Slack KO-Tieren zu beobachten, während die weiblichen Wurfgeschwister unabhängig vom Genotyp eine Infarktgröße von ca. 20 - 25 % aufzeigten (Abb. 3.11 D). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Kompensation der Slack-Deletion unter I/R in den weiblichen KO-Tieren zu erklären.

Aus dem klinischen Alltag ist bekannt, dass das prämenopausale weibliche Geschlecht weniger anfällig für das Auftreten ischämischer Herzerkrankungen im Gegensatz zu Männern gleichen Alters ist (Ostadal & Ostadal 2014; Visseren et al. 2021). Die postmenopausale Risikozunahme bei Frauen, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln, lässt auf das weibliche Sexualhormon Östrogen als protektiven Modulator schließen. Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozyten der Ratte identifizierten 17 $\beta$ -Estradiol (E2) als Suppressor übermäßiger ROS-Akkumulation und Apoptose bei H/R *in vitro* (Kim et al. 2006; Liu et al. 2014). Bestätigt wurden diese Befunde durch I/R *in vivo* an weiblichen Mäusen nach Ovariectomie. Die E2-Behandlung dieser Tiere reduzierte die ursprüngliche Infarktgröße durch Aktivierung der mitochondrialen *pro-survival* Kinase p38 $\beta$ -MAPK (*mitogen-activated protein*

kinase) und der ROS-Radikalfänger Mangan-Superoxid-Dismutasen (MnSOD) (Luo et al. 2016). Interessanterweise implizieren Ganzzell-*Patch Clamp*-Aufnahmen in Slack-exprimierenden HEK293-Zellen eine Zunahme des K<sup>+</sup>-Auswärtsstroms nach E2-Stimulation (Zhang et al. 2005). Dabei wird eine direkte Bindungsinteraktion zwischen E2 und Slack vermutet, da die Behandlung mit dem Östrogenrezeptor (ER)-Blocker Tamoxifen keinen Einfluss auf die E2-vermittelte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit hatte (Kaczmarek 2013). Auch wenn diese Interaktion keine Erklärung für den in Abb. 3.11 D beobachteten Phänotyp von weiblichen Slack KO-Mäusen bei I/R ist, könnte dennoch das infarktlimitierende Wirkspektrum von E2 entscheidend sein. Aufgrund der hohen Homologie der K<sub>Na</sub>-Kanäle ist auch eine E2-abhängige Aktivierung von Slack in den Weibchen denkbar, was für die Slack-Defizienz kompensiert. Ein ähnliches geschlechtsabhängiges Phänomen zeigte sich in I/R-Studien an murinen NCX-Mutanten (Cross et al. 1998; Sugishita et al. 2001). Die dominante Isoform NCX1 ist das Haupttransportsystem für Ca<sup>2+</sup> am Herzen und betreibt in Abhängigkeit des Ruhemembranpotentials einen Ca<sup>2+</sup>-Efflux (Chen & Li 2012). Unter pathophysiologischen Bedingungen, d. h. infolge der Akkumulation von [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und der Membrandepolarisation bei I/R, findet ein Richtungswechsel des Austauschers statt. Der nun vorliegende Ca<sup>2+</sup>-Influx via *reverse-mode* NCX provoziert zelltoxische Effekte in Kardiomyozyten. Konsequenterweise führte die Deletion von NCX zu einer Kardioprotektion bei globaler I/R im *ex vivo* Langendorff-Modell (Imahashi et al. 2005), während die NCX-Überexpression eine gesteigerte Myokardschädigung verursachte (Cross et al. 1998). Letzteres zeigte sich jedoch nur in männlichen NCX-Tg-Mäusen, während die NCX-Überexpression in weiblichen Tieren keine Zunahme des I/R-Schadens zur Folge hatte. Mechanistische Untersuchungen von Sugishita et al. identifizierten erneut E2 als regulatorische Determinante. So führte die Administration von E2 in männlichen NCX-Tg-Mäusen zu einer Reduktion der übermäßigen [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Akkumulation und sekundär zu einer Abschwächung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Zunahme infolge eines MI (Sugishita et al. 2001). Dieser akute Effekt könnte auf die antioxidativen Eigenschaften von E2 zurückzuführen sein, die beispielsweise den Funktionserhalt der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase an Synapsen kortikaler Neurone im Zuge exzitotoxischer bzw. neurodegenerativer Prozesse bewirkten (Keller et al. 1997). Prinzipiell könnte eine geringere [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Akkumulation während I/R durch die modulierenden Effekte von E2 ein erster Anhaltspunkt sein, weshalb die Offenwahrscheinlichkeit des Na<sup>+</sup>-aktivierten Slack-Kanals von untergeordneter Rolle für das Infarktgeschehen in weiblichen Mäusen ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte eine Ovariectomie an weiblichen Slack KO-Mäusen durchgeführt werden. Im I/R-Modell *in vivo* sollte infolgedessen der endogene E2-Mangel eine erhöhte Infarktgröße, ähnlich zu den männlichen Slack-KO Tieren (Abb. 3.11 B) provozieren.

Die erhöhte Vulnerabilität in männlichen Slack KO-Mäusen (Abb. 3.11 B) deutet auf eine Slack-abhängige Aktion zur Limitation des kardialen I/R-Schadens hin. Demnach scheint die Kanalexpression, möglicherweise abhängig vom Hormonstatus der Tiere, von großer Bedeutung für das zelluläre Überleben nach akutem MI zu sein. Die weiteren *in vivo*-Untersuchungen zur Konkretisierung der Bedeutung von Slack bei I/R erfolgten ausschließlich an männlichen Tieren mit globaler (bzw. Kardiomyozyten-spezifischer) Slack-Deletion.

### 4.3.3 Identifikation von Slack als Komponente kardioprotektiver Strategien zur Reduktion des I/R-Schadens

Die in Kapitel 3.5 beschriebene *in vivo* Studie an globalen Slack KO-Mäusen zeigte erstmals, dass die I/R-bedingte Schädigung am Myokard durch die Slack-Expression moduliert wird (Abb. 3.11 B). Unabhängig von der Konditionierungsstrategie bestätigte sich wiederholend eine signifikant erhöhte Vulnerabilität der Slack KO-Tiere bei I/R gegenüber den WT-Wurfgeschwistern (Abb. 3.12 B und Abb. 3.13 B). Ein ähnliches Verhalten bei I/R *in vivo* konnte bereits in Studien an Mäusen mit globaler und Kardiomyozyten-spezifischer Ablation des BK-Kanals, ebenfalls ein Mitglied der *Slo*-Genfamilie, gezeigt werden (Frankenreiter et al. 2017). Interessanterweise führte die globale Deletion des paralogen  $K_{Na}$ -Kanals Slick zu keiner Veränderung der Infarktgröße nach I/R (Abb. 6.7). Unabhängig davon konnte Slick in *ex vivo* Studien als entscheidende Komponente für den APC-vermittelten Herzschutz bei I/R identifiziert werden (Wojtovich et al. 2016). Bei der Anwendung des *ex vivo* I/R-Modells durch Langendorff-basierte Perfusion isolierter Herzen von *Slo2.x*-defizienten Mutanten (Slick KO, Slack KO, Slick/Slack DKO) führte die Isofluran-Präkonditionierung zu einer identisch großen Infarktreduktion in WT- und Slack KO-Herzen. Eine solche Anästhetikum-vermittelte Kardioprotektion konnte hingegen in Slick KO und Slick/Slack DKO nicht festgestellt werden (Wojtovich et al. 2016). Diese Untersuchungen am murinen Modell stehen im Einklang mit den bereits 2011 publizierten Beobachtungen an *C.elegans*. So wurde von verminderten Effekten der APC in Form einer erhöhten Zelltodrate unter Hypoxie an *Slo2*-Mutanten berichtet (Wojtovich et al. 2011). In Übereinstimmung zu diesen Befunden führte auch die hier gezeigte Isofluran-Konditionierung *in vivo* zu einer statistisch gleich verteilten Infarktgrößenreduktion in WT- und Slack KO-Tieren (Abb. 3.12 B, C). Bekanntermaßen haben volatile Anästhetika nicht nur einen Einfluss auf das Ausmaß der Gewebeschädigung, dass in der vorliegenden Arbeit durch die Ermittlung der Infarktgröße untersucht wurde, sondern auch auf die Wiederherstellung der myokardialen Kontraktilität nach I/R (Wartier et al. 1988). Eine Bewertung der postischämischen funktionalen Regeneration der Herzen gelingt beispielsweise durch Erfassung des Kreuzprodukts aus HF und linksventrikulärem systolischen Blutdrucks (*rate pressure product*, RPP) als Surrogat für die myokardiale Kontraktilität (Palatini & Julius 1997). Aufgrund der Slick-Deletion konnte die APC das RPP in Slick KO-Herzen nach I/R nicht verbessern, während in WT- und Slack KO-Herzen eine APC-vermittelte Funktionswiederherstellung des Myokards gegenüber I/R berichtet wurde (Wojtovich et al. 2016). Schlussfolgernd ist eine Beteiligung von Slack an der Signaltransduktion der APC auszuschließen, da die globale Slack-Deletion zu keiner Beeinträchtigung der funktionalen noch morphologischen Parameter infolge der Konditionierungsstrategie führte.

Neben APC ist die mechanische Konditionierung am Myokard eine weitere protektive Strategie, das Infarktausmaß bei MI zu reduzieren (Hausenloy & Yellon 2013). Bei der Anwendung von iPost zeigte sich der kardioprotektive Benefit in Slack KO-Herzen deutlich reduziert gegenüber den Herzen der WT-Wurfgeschwister (Abb. 3.13 C). Um den vollen Herzschutz bei mechanischer Konditionierung auszulösen, scheint ein Zusammenspiel zwischen dem Slack-Kanal und der komplexen Signaltransduktion von iPost notwendig zu

sein. Bereits identifizierte Sequenzen am C-Terminus des Slack-Kanals bestätigen neben der Na<sup>+</sup>-abhängigen Regulation der K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit via RCK2-Domäne (Yuan et al. 2003; Zhang et al. 2010) auch ein Substrat-abhängiges Aktivitätsmuster des Kanals z. B. über das PDZ-Bindungsmotiv oder die Phosphorylierung an S407 (Santi et al. 2006; Uchino et al. 2003). Zusätzlich zur Regulation des K<sup>+</sup>-Ionenflusses könnte durch die Interaktion zwischen dem C-terminalen Ende von Slack und zyttoplasmatischer Proteine eine dadurch bedingte Modulation intrazellulärer Signalwege wie z. B. bei iPost stattfinden (Ehinger et al. 2021; Fleming et al. 2016; Lee et al. 2014).

Auch der BK-Kanal in Kardiomyozyten konnte im Rahmen von I/R-Studien *in vivo* als Mediator von iPost identifiziert werden (Frankenreiter et al. 2017). Die Gegenüberstellung zu einer globalen BK KO-Mutante nach I/R zeigte Veränderungen der ROS-Level und apoptotischer Prozesse sowie eine BK-abhängige Rekrutierung des RISK-Signalwegs via Akt und ERK. Im Gegensatz zu BK zeigte sich in Western Blot-Analysen an I/R-konditionierten Herzen von WT und Slack KO-Herzen kein Slack-abhängiger Unterschied bei der Aktivierung von Akt und ERK (Abb. 3.14). Die Bedeutung der *prosurvival*-Kinase Akt für die iPost-vermittelte Kardioprotektion wurde unter Anwendung des identischen Konditionierungsprotokolls (Abb. 2.5 B), d. h. 6 Intervalle à 10 s Reperfusion und 10 s Reoxygenierung, in *ex vivo* Studien an isolierten Rattenherzen nachgewiesen (Tsang et al. 2004). Western Blot Analysen an iPost-konditionierten Herzen bestätigten signifikant erhöhte Phosphorylierungslevel von Akt, die wiederum durch pharmakologische Blockade der *upstream*-Kinase PI3K (siehe 1.2.2) inhibiert wurden und zu einer Aufhebung des beobachteten Herzschutzes führten. Analog dazu verursachte auch die pharmakologische Inhibition der ERK-Aktivierung unmittelbar zu Reperfusionbeginn ein Ausbleiben der Kardioprotektion durch iPost (Yang et al. 2004). Trotz der Mannigfaltigkeit an Publikationen, die die Komplexität des RISK-Signalwegs kontinuierlich ergänzen, sind die zwei Signalkaskaden PI3K-Akt und MEK1-ERK ein Angelpunkt der RISK-Signaltransduktion (Hausenloy et al. 2005; Heusch 2015; Rossello & Yellon 2018). In ähnlicher Weise zu den hier beschriebenen Studien sind weitere mechanistische Untersuchungen unter zusätzlicher Konditionierung durch iPost an WT- und Slack KO-Tieren notwendig, um ein funktionales Zusammenspiel zwischen dem Slack-Kanal und den *prosurvival* Kinasen Akt und ERK bei mechanischer Konditionierung sicher auszuschließen.

#### **4.4 Der kardiomyozytäre Slack-Kanal ist verantwortlich für das Ausmaß der I/R-Schädigung am Myokard**

##### **4.4.1 $\alpha$ MHC-Cre-vermittelte DNA-Rekombination von Slack in Kardiomyozyten**

Ausgehend von den Erkenntnissen der I/R-Studien an der globalen Slack KO-Maus (Abb. 3.11 - Abb. 3.13) sollte nun die Beteiligung zellspezifischer Slack-Kanäle geklärt werden. Unter Berücksichtigung der neuronalen Expressionsdichte (Rizzi et al. 2016) war anfänglich eine zentralnervöse Regulation des kardialen Phänotyps unter Verdacht. Aufgrund der in Abb. 3.10 gezeigten erhöhten Vulnerabilität in globalen Slack KO-Kardiomyozyten bei H/R *in vitro* konzentrierten sich die Arbeiten auf eine Kardiomyozyten-spezifische Deletion des Slack-Kanals. Obwohl die absolute Proteinexpression von Slack am Herzen eher gering ist (Abb.

3.1 B), befähigen die gezeigten elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals (Abb. 3.2) eine Modulation des K<sup>+</sup>-Ionenhaushalts am Kardiomyozyt (Abb. 3.3 und Abb. 3.4). Basierend auf der Annahme, dass die Na<sup>+</sup>-Akkumulation bei I/R eine Aktivierung des Slack-Kanals an der Herzmuskelzelle bewirkt und eine Membranpotentialstabilisierung via K<sup>+</sup>-Efflux initiiert, wurden CM Slack KO-Mäuse mittels der konstitutiv aktiven  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase generiert (Agah et al. 1997). Im adulten Kardiomyozyt ist die Expression dieses Cre-Transgens unter der Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen  $\alpha$ MHC (*Myh6*)-Promotors die gängigste Vorgehensweise zur Manipulation kardialer Zielgene. Nichtsdestotrotz birgt der Einsatz der Cre zusätzliche *off-target*-Effekte, die sich negativ auf die Myokardfunktion auswirken können (Pugach et al. 2015). Cre-provozierte, DNA-schädigende Effekte im Kardiomyozyt konnten bereits als ursächlich für eine kontraktile Dysfunktion, Fibrose und zelluläre Infiltration am Herzen identifiziert werden. Obwohl diese Effekte v. a. unter Verwendung der Tamoxifen-induzierbaren  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase ( $\alpha$ MHC-MerCreMer) berichtet wurden (Wang et al. 2020), ist der Einsatz einer Cre-positiven Kontrolle  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> grundsätzlich von großer Wichtigkeit für die korrekte Interpretation der in Kapitel 3.8 ff. gezeigten Befunde.

Die spezifische Deletion von Slack im Kardiomyozyt wurde anhand genomischer PCR-Analysen an isolierten Gewebe- und Zellproben von  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup>Slack<sup>fl/+</sup>-Mäusen (Abb. 3.15) demonstriert. Eine Konversion des geflochtenen Allels zum KO-Allel bestätigte sich ausschließlich in kardialen Proben. Die Effizienz der Cre-Rekombinase konnte zuvor durch zusätzliche Verpaarung mit ROSA<sup>mTG/+</sup>-Mäusen demonstriert werden (Frankenreiter et al. 2017). Während der Cre-negative Genotyp (ROSA<sup>mTG/+</sup>  $\alpha$ MHC-Cre<sup>+/+</sup>) keine Veränderung der Zellmembran-lokalisierten roten Fluoreszenz im Reportermodell zeigte, führte die Expression der  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase (in ROSA<sup>mTG/+</sup>  $\alpha$ MHC-Cre<sup>Tg/+</sup> doppel-transgenen Mäusen) zu einer grünen Fluoreszenzverschiebung am Myokard. Die quantitative Auswertung bestätigte eine Cre-Rekombinase-Effizienz von 98,97 % im Herzgewebe (Frankenreiter et al. 2017).

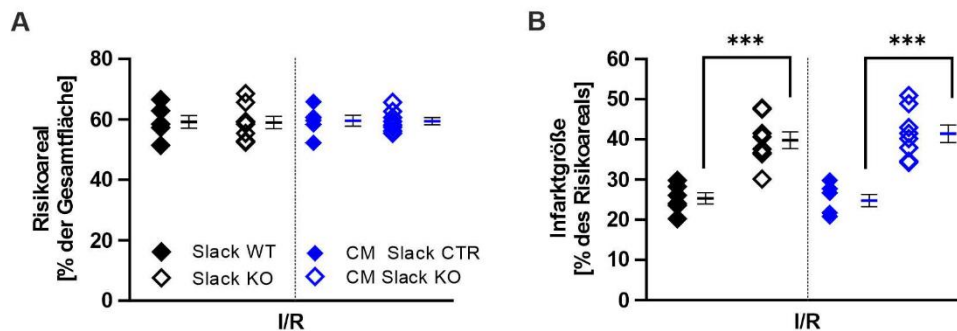
Zum aktuellen Zeitpunkt fehlt noch der Slack-Nachweis auf Proteinebene in CM Slack-Mutanten. Initiale Western Blot-Experimente mit isolierten Herzmuskelzellproben aus CM Slack CTR waren bisher bzgl. des Slack-Proteinnachweises nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen hierfür sind unklar, sicherlich spielt dabei die geringe Expressionsdichte des Kanals im Herzen generell eine Rolle (siehe 3.1).

#### **4.4.2 Die kardiomyozytäre Deletion des Slack-Kanals ist ursächlich für den kardiovaskulären Phänotyp bei I/R *in vivo***

Untersuchungen zur Bedeutung des kardiomyozytären Slack-Kanals bei I/R *in vivo* erfolgten anhand konditionaler Slack-Mutanten, die wie bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben durch den Einsatz der  $\alpha$ MHC-Cre-Rekombinase generiert wurden. In Übereinstimmung mit den Daten der globalen Mutante (Lu et al. 2015) zeigten auch CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäuse einen klinisch unauffälligen Phänotyp. Im Rahmen der Zuchtarbeiten für die vorliegende Arbeit wurden > 400 Versuchstiere geboren, die keine ersichtlichen Veränderungen der Anatomie, des Verhaltens oder der Fertilität aufwiesen. Darüber hinaus hatte die Deletion des kardiomyozytären Slack-Kanals weder einen apparenten Einfluss auf das Geschlecht noch resultierte hieraus ein Einfluss auf das Gesamtüberleben der Mäuse.

Echokardiographische (Abb. 3.16 und Abb. 3.17) und Blutdruck-telemetrische Analysen (Abb. 3.18) an CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen bestätigten einen intakten kardiovaskulären Phänotyp der Tiere unter physiologischen Bedingungen. Die Datenerhebung für die Bewertung der Blutdruckregulation erfolgte idealerweise unter vollem Bewusstsein der Tiere. Grundsätzlich kann die Narkotisierung der Mäuse durch z. B. volatile Anästhetika bei der Durchführung der Echokardiographie eine Verschiebung der myokardialen Parameter verursachen (Constantinides et al. 2011; Gargiulo et al. 2012). Unter den möglichen Anästhetika zählt Isofluran zu den am besten geeigneten Inhalativa mit milden kardiodepressiven Eigenschaften und guter Steuerbarkeit (Gao et al. 2011; Kober et al. 2004; Roth et al. 2002). Die vorliegenden Messungen an Isofluran-narkotisierten Mäusen erfolgten allesamt bei einer kontrollierten Herzrate (Respress & Wehrens 2010) von 400 - 500 bpm (siehe tabellarische Übersicht in Appendix 6.14) zur Sicherstellung interpretierbarer Ergebnisse in Bezug auf die Funktionalität des Slack-Kanals. Ausgehend von der Annahme, dass der kardiale Slack-Kanal durch erhöhte  $[Na^+]_i$  ( $EC_{50}$  41 mM) aktiviert wird (Bhattacharjee et al. 2003), zeigten sich zunächst unter physiologischen Bedingungen und einem intrazellulären  $Na^+$ -Gehalt von  $< 10$  mM (Murphy & Eisner 2009) eine erwartungsgemäß intakte, unveränderte Myokardfunktion (Abb. 3.16 und Abb. 3.17) und Blutdruckregulation (Abb. 3.18) in CM Slack KO-Tieren.

Unter kardialer Ischämie konnten Na-NMR-Studien eine 3 - 4-fache Zunahme der  $[Na^+]_i$  auf Level von 25 - 40 mM innerhalb von kurzer Zeit nachweisen (Pike et al. 1993). Entsprechend zeigte sich unter den pathophysiologischen Gegebenheiten bei I/R *in vivo*, dass die kardiomyozytäre Deletion des Slack-Kanals verantwortlich für ein übermäßiges Infarktgeschehen ist. Erneut bestätigte sich in männlichen CM Slack KO-Herzen eine signifikant erhöhte Infarktgröße gegenüber den Herzen der CM Slack CTR-Wurfgeschwister (Abb. 3.19 B). Bei der Gegenüberstellung der nekrotischen Areale der globalen und Kardiomyozyten-spezifischen Mutanten (Abb. 4.2 B) zeichneten sich deckungsgleiche Ausmaße an Myokardschädigung in Abhängigkeit der Slack-Expression ab (Slack WT:  $25,34 \pm 1,41$  % vs. CM Slack CTR:  $24,79 \pm 1,53$  % und Slack KO:  $39,79 \pm 2,10$  %, vs. CM Slack KO:  $41,42 \pm 2,15$  %).



**Abb. 4.2 Gegenüberstellung der Myokardschädigung in globalen und konditionalen Slack-Mutanten**

**(A)** Darstellung des Risikoareals (% der Gesamtherzfläche) nach I/R (30 min/2 h) in globalen WT- und Slack KO-Tieren (schwarz) sowie konditionalen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen (blau). Unabhängig von der genetischen Manipulation bestätigen sich stabile Risikoareale von ca. 60 %. **(B)** Gegenüberstellung der Infarktgrößen nach I/R in globalen und konditionalen Mutanten. Die globale und Kardiomyozyten-spezifische Deletion verursachten eine signifikante Zunahme an Myokardschädigung in Bezug auf die jeweilige Kontrolle. Das Infarktareal ist identisch groß zwischen Slack KO und CM Slack KO-Mäusen. Die Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{WT}$ : 6 Tiere,  $n_{Slack\ KO}$ : 8 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ CTR}$ : 6 Tiere,  $n_{CM\ Slack\ KO}$ : 8 Tiere; \*\*\* $p < 0,001$ . Die Daten sind bereits in Kapitel 3.5 (Abb. 3.11) und Kapitel 3.9 (Abb. 3.19) beschrieben.

Aufgrund des Ausmaßes der Vulnerabilität bei I/R in globalen Slack KO-Mäusen ( $39,79 \pm 2,10$  %) vs. CM Slack KO-Mäusen ( $41,42 \pm 2,15$  %) lässt sich schlussfolgern, dass der kardiomyozytäre Slack-Kanal primär verantwortlich für die Gestaltung des I/R-induzierten Schadens am Herzen ist.

Grundsätzlich ist bekannt, dass die Expression und Funktion myokardialer  $K^+$ -Kanäle bei akutem MI verändert vorliegt (Nattel et al. 2007; Yang & Nerbonne 2016). Anhand von I/R-Untersuchungen an Hundeherzen zeigten sich die verschiedenen  $K^+$ -Ströme  $I_{to,f}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$  und  $I_{K1}$  in Infarkt-betroffenen Kardiomyozyten signifikant reduziert (Dun et al. 2004; Jiang et al. 2000). Außerdem waren die Expressionslevel der  $I_{Kr}$ - und  $I_{Ks}$ -verantwortlichen Transkripte HERG und KVLQT1 innerhalb der ersten Tage nach Infarkt gesenkt (Nattel et al. 2007). In Summe bergen diese negativ modulierenden Effekte als Resultat der ischämischen Myokardschädigung ein proarrhythmogenes Risikopotential z. B. durch Verlängerung der APD oder Veränderung des Elektrokardiogramms. Darüber hinaus führt das Infarktgeschehen am Herzen zu einer Expressionszunahme von Sarkolemm-assoziierten  $K_{ATP}$ -Kanälen (Akao et al. 1997).  $I_{KATP}$  fördert die myokardiale Stresstoleranz unter Hypoxie/Ischämie, indem es die APD verkürzt, das Membranpotential stabilisiert und den  $Ca^{2+}$ -getriggerten Energieverbrauch der Zelle abschwächt (Lascano et al. 2002; Suzuki et al. 2002; Zhu et al. 2011).

In welcher Form der Slack-Kanal bei I/R zu einem normalen Infarktgeschehen am Herzen beiträgt, ist bislang nicht untersucht. Es besteht die Vermutung, dass  $I_{KNa}$  zu einer Verkürzung der APD bei hoher Herzrate oder in ischämischen Randgebieten beiträgt (Veldkamp et al. 1994). Die  $Na^+$ -abhängige Aktivierung des  $K^+$ -Auswärtsstroms z. B. durch die im Rahmen pathophysiologischer Konditionen mögliche Inhibition der  $Na^+/K^+$ -ATPase (Luk & Carmeliet 1990) könnte zur Stabilisierung des elektrochemischen Gradienten verhelfen und somit einer übermäßigen Membrandepolarisation bei Ischämie am Herzen entgegenwirken (Dryer 1994; Kameyama et al. 1984).

#### 4.4.3 Die durch mechanische Konditionierung vermittelte Protektion in CM Slack CTR-Tieren steht im Zusammenhang mit $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$

Myokardiale  $\text{K}^+$ -Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion protektiver Stimuli bei I/R am Herzen (Lukowski et al. 2021). Die mechanische Konditionierung des Herzens ist einer dieser Stimuli, der, wie bereits in Kapitel 1.2.2.2 und 1.2.2.3 ausführlich beschrieben, in Abhängigkeit des Zeitpunkts der konditionierenden Gefäßokklusion (vor oder nach dem Hauptinsult) als iPre oder iPost betitelt wird (Heusch 2015). Nachdem eine verminderte Protektion bei iPost in globalen Slack KO-Mäusen zu beobachten war (Abb. 3.13 C), stellte sich die Frage, ob dieser Effekt erneut der Deletion des kardiomyozytären Slack-Kanal geschuldet ist. Um den verantwortlichen Slack-Kanal zu identifizieren, wurde das mechanische Behandlungsregime (siehe 2.4.4.6) an CM Slack-Mutanten wiederholt (Abb. 3.20). Die mechanische Konditionierung an CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen bestätigte die Verantwortlichkeit des kardiomyozytären Slack-Kanals für die beobachtete Kardioprotektion bei I/R in zweierlei Hinsicht: Zunächst bestärkte die erneut signifikant erhöhte Infarktgröße in CM Slack KO-Mäusen (Abb. 3.20 B) die Bedeutung des Slack-Kanals in Kardiomyozyten bei der Entstehung des myokardialen Schadens. Des Weiteren veranschaulichte die prozentuale Infarktgrößenreduktion nach mechanischer Konditionierung in Abb. 3.20 C eine Beteiligung des kardiomyozytären Slack-Kanals an der protektiven Signaltransduktion am Herzen. Nach iPost an CM Slack KO-Mäusen ( $-26,30 \pm 1,64 \%$ ) bestätigte sich ein signifikant reduzierter Herzschutz im Vergleich zu den CM Slack CTR-Tieren ( $-49,57 \pm 2,30 \%$ ) in identischem Ausmaß, wie bereits in den Studien an den globalen Mutanten (WT:  $-51,79 \pm 5,26 \%$  vs. Slack KO:  $-26,30 \pm 2,02 \%$ ). In identischer Weise zu iPost zeigte sich auch infolge von iPre (Abb. 3.20) ein reduzierter kardioprotektiver Effekt an CM Slack KO ( $-31,63 \pm 2,22 \%$ ) gegenüber den CM Slack CTR ( $-53,15 \pm 2,84 \%$ ). Aufgrund der hier beobachteten, prozentual identischen Reduktion der Myokardschädigung durch iPost und iPre wird die in der Literatur beschriebene Annahme aufgegriffen, dass der kardioprotektive Effekt durch mechanische Konditionierung derselben Signaltransduktion und unter Beteiligung identischer Signalmoleküle erfolgt (Hausenloy et al. 2005; Heusch 2015). Trotz der Deletion des kardiomyozytären Slack-Kanals zeigte sich ein verbleibender Restschutz am Myokard von CM Slack KO-Tieren (Abb. 3.20 C), was auf zeitgleich stattfindende, protektive Signalkaskaden unabhängig von Slack schließen lässt. Neben Slack werden in der Literatur weitere Mediatoren/Effektoren (z. B. BK, GC,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) beschrieben, die bei globaler und (z. T. Kardiomyozyten-spezifischer) Deletion am Mausmodell einen Funktionsverlust von iPost und iPre bei I/R zur Folge hatten (Frankenreiter et al. 2017; Frankenreiter et al. 2018; Suzuki et al. 2002; Wojtovich et al. 2013).

Zu den bereits identifizierten Signalproteinen und -kaskaden bei mechanischer Konditionierung zählt primär der RISK-Signalweg unter Beteiligung von Akt und ERK. Ein Zusammenhang zwischen RISK und Slack bei I/R konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 3.14 A - D). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus der *pro-survival* Kinasen in I/R-geschädigten Herzen von WT- und Slack KO-Mäusen ohne zusätzlichen mechanischen Stimulus untersucht wurde. Da Slack sowohl als Modulator des transmembranären  $\text{K}^+$ -Stromflusses (Zhang et al. 2010) als auch als

Mediator zytoplasmatischer Signalkaskaden (Fleming et al. 2016) diskutiert wird, ist ein dualer Wirkmechanismus von Slack bei I/R und mechanischer Konditionierung denkbar.

Weitere Untersuchungen unter zusätzlicher Aktivierung der iPost- bzw. iPre-assoziierten Signaltransduktion (mechanisch oder pharmakologisch) sind notwendig, um einen Zusammenhang von Slack mit dem RISK-Signalweg sicher auszuschließen.

Wie in verschiedenen Publikationen gezeigt, hat zudem der GC/cGMP/cGKI-Signalweg einen Einfluss auf die Gestaltung des myokardialen Schadens bei I/R. Nach Aktivierung der Kaskade via PI3K und Akt, gefolgt von der NO-Generierung via NOS und anschließender Formierung von cGMP via GC, konnte die Rekrutierung von cGKI als Mediator im Zusammenhang mit iPre und iPost beschrieben werden (Burley et al. 2007; Costa et al. 2008; Oldenburg et al. 2004). Der kardioprotektive Effekt dieser Signalkaskade wird auf mitochondrialer Ebene determiniert, indem eine moderate ROS-Bildung die Öffnung der mPTP inhibiert und die Zelle dadurch vor nekrotischem Zelltod schützt (Garlid et al. 2003). Eine Interaktion von cGKI mit den mitochondrial lokalisierten K<sup>+</sup>-Kanälen BK (Frankenreiter et al. 2017) und mitoK<sub>ATP</sub> (Costa et al. 2005) im Kardiomyozyt wird postuliert, was durch den K<sup>+</sup>-Influx in die Mitochondrienmatrix die Entkopplung der ETC verhindern könnte. Eine pharmakologische Aktivierung des GC/cGMP/cGKI-Signalwegs gelingt durch Applikation des GC-Aktivators Cinaciguat (Salloum et al. 2012). Die GC kommt im Organismus als native Häm-haltige und dysfunktionale Häm-freie Form vor. Das Phenylethylamin-Derivat Cinaciguat aktiviert die NO-insensitive dysfunktionale GC, die v. a. durch oxidativen Stress bei kardiovaskulären Erkrankungen entsteht. Dies induziert die Produktion des Botenstoffs cGMP und die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase cGKI, die je nach Zielzelle z. B. vasodilatierend, thrombozytenaggregationshemmend oder entzündungshemmend wirkt (Hofmann et al. 2006). Am Myokard bewirkte die protektive Stimulation der GC/cGMP/cGKI-Signalkaskade via Cinaciguat eine Senkung der Infarktgröße nach I/R (Methner et al. 2013). Das Ausbleiben des Cinaciguat-vermittelten Herzschutzes in Kardiomyozyten-spezifischen BK KO-Mäusen identifizierte den mitochondrialen BK-Kanal als *downstream target* des kardioprotektiven Signalwegs (Frankenreiter et al. 2017). In Analogie zu diesen Befunden bestätigte sich der Infarktgrößen-reduzierende Effekt von Cinaciguat am Herzen in den in Abb. 3.20 gezeigten Untersuchungen an CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R *in vivo*. Aufgrund der Tatsache, dass die Slack-Deletion im Kardiomyozyt keinen Genotyp-abhängigen Effekt nach pharmakologischer Administration des GC-Aktivators auslöste, wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Slack-Kanal kein Effektor des GC/cGMP/cGKI-Signalwegs ist.

Eine protektive Signaltransduktion, wie z. B. die der eben beschriebenen Signalwege RISK und GC/cGMP/cGKI, kommt v. a. auf mitochondrialer Ebene zum Tragen (Heusch 2015). Dies gelingt beispielsweise durch Modulation der ROS-Level, Inhibition der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation und Blockade der mPTP-Öffnung (Lukowski et al. 2021). Dabei ist zumeist die Signaltransduktion ausgehend vom Zytoplasma ans Mitochondrium bzw. an die IMM, d. h. die Überwindung der Mitochondrienmembran, eine noch zu klärende wissenschaftliche Fragestellung (Adler et al. 2020; Costa et al. 2005). Unter den diskutierten Transportsystemen wird der PKC $\epsilon$  eine besondere Bedeutung zugesprochen. Im Rahmen von iPre-Versuchen am Tiermodell konnte das Isoenzym als elementarer Mediator für den iPre-vermittelten Herzschutz entdeckt werden (Inagaki et al. 2006). Ausgehend von der ursprünglichen

Translokationstheorie (Liu et al. 1994b) ist PKC $\epsilon$  nach Aktivierung in der Lage, ins Mitochondrium zu translozieren und kardioprotektive Effekte auf Organellebene zu vermitteln (Budasz et al. 2010; Ping et al. 1997). Weitere Studien benennen unterschiedliche PKC $\epsilon$ -Kompartimente (*pool/s*), die distinkte Aufgaben im Mitochondrium übernehmen (Costa & Garlid 2008). Es besteht die Hypothese, dass die PKC $\epsilon$ -vermittelte Kardioprotektion durch eine direkte Stimulation von Triggersubstanzen an G $_q$ PCRs wie z. B. Adenosin an A $_1$ /A $_3$ -Rezeptoren, im Zuge von iPre am Herzen angestoßen wird (Inagaki et al. 2006; Murphy & Frishman 2005). Die heptahelikalen G $_q$ PCRs formieren die intrazellulären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) via Effektorprotein Phospholipase C, sodass DAG die Aktivierung von PKC $\epsilon$  ermöglicht. Nach der Translokation ans Mitochondrium stimuliert PKC $\epsilon$  beispielsweise die Öffnung von mitoK $_{ATP}$ , dessen K $^+$ -Influx in die Matrix eine übermäßige ROS-Bildung inhibiert, die Ca $^{2+}$ -Überladung des Organells verhindert und dem Zellkollaps durch Blockade der mPTP-Öffnung entgegenwirkt (Costa & Garlid 2008; Downey et al. 2007).

Auch der Slack-Kanal besitzt eine Phosphorylierungsstelle für PKC an Position S407 des zyttoplasmatischen C-Terminus (Barcia et al. 2012). Zudem sind seine biophysikalischen Eigenschaften an G $_q$ PCRs (Fleming & Kaczmarek 2009) wie z. B. den metabotropen Glutamatrezeptor 1 (mGluR1) (Nanou & El Manira 2010), den muskarinergen Acetylcholinrezeptor 1 (mAChR1 oder M $_1$ R) oder den Angiotensin II-Rezeptor (AT $_1$ R) (Santi et al. 2006) gekoppelt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen PKC $\epsilon$  und Slack (Kaczmarek 2013) bei I/R am Myokard zu prüfen, erfolgten Western Blot-Analysen an I/R-geschädigten WT- und Slack KO-Herzen, in denen die Expression der (p)PKC $\epsilon$  untersucht wurde (Abb. 3.14 E, F). Die aktuellen Ergebnisse zeigen ausschließlich in den WT-Proben und in Abhängigkeit der Reperfusionzeit eine Rekrutierung der PKC $\epsilon$  durch Zunahme des Phosphorylierungsgrads. Ein Ausbleiben der PKC $\epsilon$ -Aktivierung in Slack KO-Proben könnte auf eine putative Phosphorylierung von Slack durch PKC $\epsilon$  hindeuten.

Die Aktivität von PKC $\epsilon$  als zytoplasmatischer Mediator bei iPre (Liu et al. 1994b; Ohnuma et al. 2002) führt auf mitochondrialer Ebene zum K $^+$ -Influx ins Mitochondrium via mitoK $_{ATP}$ . Dies stellt ein zentraler Mechanismus für den Erhalt der mitochondrialen und zellulären Integrität dar (Costa & Garlid 2008; Garlid et al. 2003). Besteht tatsächlich ein mechanistischer Zusammenhang in Form eines zellulären Signalkomplexes (Lee et al. 2014) zwischen dem kardiomyozytären Slack-Kanal und einer zytoplasmatischen Komponente wie z. B. PKC $\epsilon$ , könnte die Slack-Deletion für eine negative Modulation von mitoK $_{ATP}$  verantwortlich sein. Dies wiederum könnte ursächlich für einen reduzierten Herzschutz bei mechanischer Konditionierung sein (Abb. 3.20 C).

Diese Hypothese wurde im Verlauf dieser Arbeit durch die pharmakologische Inhibition von mitoK $_{ATP}$  unter Verwendung des selektiven mitoK $_{ATP}$ -Antagonisten 5-HD untersucht. Wie in der Literatur beschrieben (O'Rourke 2004; Wojtovich et al. 2013), führte die Administration von 5-HD ohne zusätzlichen protektiven Stimulus (pharmakologisch oder mechanisch) zunächst zu keiner Modulation der Infarktgröße (Daten nicht gezeigt).

Bei gleichzeitiger iPre verursachte 5-HD ausschließlich in den Slack-positiven CTR-Herzen einen Verlust des iPre-vermittelten Herzschutzes (Abb. 3.22 D). Der maximal mögliche Herzschutz durch iPre (Abb. 3.20 C) in CM Slack CTR-Tieren wurde durch die gleichzeitige

mitoK<sub>ATP</sub>-Inhibition auf das Niveau von I/R + iPre-behandelte CM Slack KO-Herzen abgeschwächt (Abb. 3.22 C). Interessanterweise hatte die zusätzliche mitoK<sub>ATP</sub>-Inhibition bei iPre-Konditionierung in CM Slack KO-Tieren keinen negativen Einfluss auf die I/R-abhängige Herzschiädigung. Eine Gegenüberstellung (Ermittlung der  $\Delta$  Infarktgröße [in %]: I/R + iPre + 5-HD vs. I/R + iPre) zu den in Abb. 3.20 B beobachteten Infarktgrößen bei I/R + iPre ohne 5-HD-Stimulation veranschaulicht eindrucksvoll den isolierten Effekt von 5-HD in CM Slack CTR-Herzen (Abb. 3.22 D). Auch in bereits publizierten Studien zeigte die Kombination aus iPre und pharmakologischer Behandlung mit 5-HD eine Reversion des iPre-vermittelten Herzschutzes (Fryer et al. 2000; Sato et al. 2000). An *ex vivo* perfundierten WT-Herzen der Maus führte das Behandlungsregime zu einem vollständigen Angleich der Parameter Infarktgröße und funktionelle Erholung (RPP) auf das Ausgangsniveau bei reiner I/R (Wojtovich et al. 2013). Nachdem die molekulare Natur von mitoK<sub>ATP</sub> bestehend aus MITOSUR und MITOK (Kanalpore-formende Untereinheit) identifiziert wurde, zeigte die globale MITOK KO-Mutante zunächst keine Unterschiede bzgl. der Infarktgröße bei I/R *in vivo* im Vergleich zur WT-Kontrolle (Paggio et al. 2019). Erst durch die pharmakologische Präkonditionierung mit dem selektiven mitoK<sub>ATP</sub>-Aktivator Diazoxid konnte spezifisch die mitoK<sub>ATP</sub>-abhängige Kardioprotektion in Form einer reduzierten Myokardschiädigung nach Ischämie dargestellt werden (Baines et al. 1999; Garlid et al. 1997; O'Rourke 2004; Wojtovich et al. 2013). Erwartungsgemäß führte das iPre-simulierende pharmakologische Manöver in MITOK-defizienten Herzen zu keiner schützenden Aktion am Myokard (Paggio et al. 2019). Diese Befunde (Abb. 3.22) erlauben die Schlussfolgerung, dass ein intaktes Zusammenspiel zwischen dem kardiomyozytären Slack-Kanal und mitoK<sub>ATP</sub> notwendig ist, um einen vollständigen Herzschutz bei mechanischer Konditionierung zu ermöglichen. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Plasmamembran-assoziierte Slack-Kanal im Kardiomyozyt ein übergeordnetes Signalübertragungselement des mitochondrial lokalisierten K<sup>+</sup>-Kanal mitoK<sub>ATP</sub> ist. Der alleinige Einsatz von 5-HD ist jedoch ungenügend, um diese konkrete mechanistische Schlussfolgerung zu ziehen (O'Rourke 2004). Für die Verifizierung sind weitere Versuche unerlässlich wie z. B. die Administration des mitoK<sub>ATP</sub>-Aktivators Diazoxid. Bestätigt sich eine Slack-abhängige Aktivierung von mitoK<sub>ATP</sub>, dann ist mittels Diazoxid ein identisch großer kardioprotektiver Effekt ( $\Delta$  Infarktgröße [in %]) unabhängig des Genotyps zu erwarten. Es ist prinzipiell anzunehmen, dass die erhöhte Vulnerabilität bei Slack-Deletion primär auf die Eigenschaft als K<sup>+</sup>-leitender Ionenkanal und die Beeinflussung der zellulären K<sup>+</sup>-Homöostase bei Ischämie zurückzuführen ist, während Slack unter zusätzlicher mechanischer bzw. pharmakologischer Intervention an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sein könnte.

#### **4.5 Das remodeling der I/R<sub>4Wochen</sub>-geschädigten Herzen ist unabhängig der Slack-Expression**

Der MI beschreibt eine irreversible Schädigung am Herzmuskel, die aufgrund einer verlängerten ischämischen bzw. hypoxischen Phase entsteht (Thygesen et al. 2018). Da adulte Kardiomyozyten nur eine begrenzte regenerative Kapazität besitzen, folgt auf den irreversiblen Myokardschaden, wie in Kapitel 1.1.2 ausführlich beschrieben, die Fibrosierung und permanente Umgestaltung des Herzens in der postischämischen inflammatorischen und

proliferativen Phase (Frangogiannis 2014). Für die präklinische Grundlagenforschung ist das chronische *in vivo* Infarktmodell von großer Bedeutung für die Untersuchung sekundärer Effekte wie z. B. das linksventrikuläre *remodeling*, dilatative Prozesse und funktionale Veränderungen (Bayat et al. 2002; Michael et al. 1995). Im Vergleich zur permanenten Ligatur führt die Strategie von I/R erwartungsgemäß zu einem milderem Infarktgeschehen und einer höheren Überlebensrate (De Villiers & Riley 2020). Nachdem das I/R-Modell *in vivo* im Jahr 1960 zunächst an Hunden etabliert wurde (Jennings et al. 1960), entwickelte sich in den Folgejahren eine Vielzahl verschiedener I/R-Modelle an unterschiedlichen Spezies mit variablen Ischämie- (15 min - 2 h) und Reperusionszeiten (24 h - 28 d) (De Celle et al. 2004; Frankenreiter et al. 2017; Gao et al. 2010; Heinen et al. 2019; Lutgens et al. 1999; Michael et al. 1999). Aus diesem Grund überrascht es nicht, dass in der Literatur über unterschiedliche Infarktausmaße und funktionale Defizite an I/R-konditionierten Herzen berichtet wurde. Hinzu kommt insbesondere im Mausmodell die technische Herausforderung an den Operateur und das eingesetzte Narkoseregime, was zu einer zusätzlichen Streuung der Ergebnisse führt (Gargiulo et al. 2012).

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgt bei I/R<sub>4Wochen</sub> mit einer voll-antagonisierbaren 3K-Narkose (Thal & Plesnila 2007) (siehe 2.4.2) in Kombination mit dem inhalativen Narkotikum Isofluran, wobei eine Verschiebung kardiovaskulärer Grundparameter zu berücksichtigen ist. Im Mausmodell führte die 3K-Injektionsnarkose zur Bradykardie und hypotonen Verschiebung von Systole und Diastole (Hjalmsdottir 2005). Insbesondere der bradykarde Effekt reduziert den O<sub>2</sub>- und Substratbedarf des Herzens, was sich mildernd auf das Ausmaß der Myokardschädigung unter Ischämie auswirken könnte. Durch Stimulation der  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren nach Applikation von Fentanyl (Xu et al. 2017) oder auch durch die analgetische Nachbehandlung mit Buprenorphin (McCormack & Chapleo 1998) sind des weiteren iPre-ähnliche kardioprotektive Effekte am Myokard möglich. Nicht zuletzt fördert auch die zusätzliche Ventilation mit Isofluran (ca. 30 min nach Gabe der Injektionsnarkotika) eine Reduzierung des I/R-Schadens basierend auf dem Prinzip der APC, d. h. durch die Manipulation von ROS, mPTP und zytoprotektiver Kaskaden via Akt und ERK (Van Allen et al. 2012). Bei der Durchführung des akuten Infarktmodells *in vivo* konnte ein Slack-abhängiger Effekt bei APC mit Isofluran ausgeschlossen werden (Abb. 3.12 C). Hingegen scheint der kardiomyozytäre Slack-Kanal an der protektiven Signaltransduktion durch mechanische Präkonditionierung bei I/R beteiligt zu sein (Abb. 3.20 C). Aus diesem Grund sollte ein Slack-Genotyp-abhängiger präkonditionierender Effekt von Fentanyl und Buprenorphin noch geprüft werden.

Die Datenerhebung an CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4Wochen</sub> präsentierte zunächst eine makroskopische hypertrophe Umgestaltung des Myokards für beide Genotypen (Abb. 3.23). In Übereinstimmung dazu zeigten auch die echokardiographischen Untersuchungen der I/R-konditionierten Herzen (Abb. 3.25 und Abb. 3.26) eine Verschlechterung der linksventrikulären Parameter im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollherzen (Abb. 3.17). Sirius Rot-Färbungen der Herzschnitte (Abb. 3.24 A) nach I/R<sub>4Wochen</sub> zeigten ein nur mildes fibrotisches Ausmaß von ca. 7 % im Myokard beider Genotypen (Abb. 3.24 B). Die kardiale Fibrose ist, wie bereits geschildert (siehe 1.1.2.3), ein typisches Phänomen, das im Zuge der pathophysiologischen Umgestaltung nach einem MI

auftritt und mitverantwortlich ist für die postischämische, systolische und diastolische Dysfunktion am Herzen (Humeres & Frangogiannis 2019). Infolge eines Ischämie-provozierten myokardialen Schadens findet ein Phänotypwechsel kardialer Fibroblasten hin zu Myofibroblasten statt, die in der proliferativen Phase ungefähr 72 h post-Infarkt aktiv die Sezernierung von Matrixproteinen anstoßen, um das nekrotische kardiale Gewebe zu ersetzen (Venugopal et al. 2022). Charakteristischerweise entsteht dadurch eine lokalisierte, ringförmige Kollagenablagerung und Narbenbildung im Ligatur-betroffenen Areal (Emde et al. 2014). Infolge des hier verwendeten Protokolls (siehe 2.4.5) zeigte sich dieses fibrotische Merkmal jedoch nur im Ansatz (siehe 3.13.2 bzw. 6.11). Auch eine ICM nach I/R<sub>4Wochen</sub> ist auszuschließen (Houser et al. 2012), da keine dafür typische Ventrikeldilatation vorliegt. Das hier beobachtete geringe myokardiale *remodeling* widerspricht dem bislang in der Literatur beschriebenen Fibrosierungsgrad von 10 % - 25 % und dem markanten Erscheinungsbild der Herzen in Studien mit ähnlichen Zeitintervallen (Emde et al. 2014; Frankenreiter et al. 2017; Rusinkevich et al. 2019). Die geschilderte, verminderte Fibroseentwicklung könnte auf das kardioprotektive neue Narkose- und Behandlungsregime zurückzuführen sein, denn auch Versuche, in denen die Reperusionszeit um 50 % (14 Tage) verkürzt wurde, enthüllten keine ausgeprägtere Myokardschädigung (Abb. 6.13 A). Dagegen konnte eine Verlängerung der Ischämiephase um 50 % auf eine Gesamtdauer von 45 min (I<sub>45min</sub>/R<sub>4Wochen</sub>) (Heinen et al. 2019) in bereits durchgeführten Vorversuchen an genetisch-unveränderten Mäusen eine effektive Narbenbildung in erwartetem Ausmaß nachweisen (Abb. 6.13 B).

Zukünftige Versuche bei I<sub>45min</sub>/R<sub>4Wochen</sub> sollen die Langzeitfolgen nach MI in Abhängigkeit von Slack konkretisieren. Ergänzend dazu ist der Einsatz von Slackmodulatoren wie z. B. dem Aktivator Niclosamid denkbar. In einem murinen HI-Modell *in vivo* durch transverse Aortenkonstriktion (TAC) führte die orale Administration von Niclosamid zu einem milderen Verlauf hinsichtlich der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie, Fibrose und Dysfunktion (Fu et al. 2021). Rückzuführen waren die Niclosamid-vermittelten Effekte u. a. auf eine verbesserte mitochondriale Respiration und ATP-Produktion in Kardiomyozyten. Auch als postischämische Behandlungsmaßnahme könnte die Pharmakon-abhängige Umgestaltung der MI-geschädigten Herzen die Bedeutung von Slack im Langzeitmodell zusätzlich beleuchten.

#### **4.6 Der kardiomyozytäre Slack-Kanal fördert den Erhalt der linksventrikulären Deformationskapazität nach Myokardinfarkt**

Das verwendete I/R<sub>4Wochen</sub>-Modell für die Untersuchung Slack-abhängiger Langzeitfolgen nach einem MI weist auf ein mildes pathophysiologisches Ereignis am Herzen hin. So deutet die, im Vergleich zur Literatur geringe fibrotische Aktivität am Myokard in beiden Genotypen (Abb. 3.24) auf eine Zellschädigung ohne unmittelbar nekrotische Konsequenzen hin. Der Zustand ähnelt einem *stunned* (betäubten) Myokard, das trotz Reperfusion für einen längeren Zeitraum funktionsgestört vorliegt (Jamal et al. 2001). Die hypertrophe Umgestaltung der Ventrikel von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen (Abb. 3.23) als kompensatorische Reaktion auf den exogenen Stimulus könnte auf eine morphologische Veränderung der Kardiomyozyten zurückzuführen sein (Heineke & Molkentin 2006). Um diese Vermutung zu überprüfen, sind histologische Untersuchungen zur Ermittlung der Sarkomerlänge, z. B. durch Hämatoxylin-

Eosin-Färbung der Kryoschnitte von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4Wochen</sub>, notwendig. Das pathophysiologische Größenwachstum der Kardiomyozyten wäre zudem eine schlüssige Erklärung für die beobachteten funktionalen Veränderungen der Herztätigkeit von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen (Abb. 3.25 und Abb. 3.26), die vermutlich nicht das Resultat eines Fibrose-bedingten Elastizitätsverlusts sind.

Die echokardiographische Erfassung der murinen Herzfunktion (Gao et al. 2011; Hoit 2006) zur Beurteilung möglicher Slack-abhängiger Langzeitfolgen nach I/R<sub>4Wochen</sub> erfolgte mittels konventioneller M-Mode-Methode (siehe 2.4.6.2) und der STE-basierten Analytik (siehe 2.4.6.3). Die eindimensionale M-Mode-Echokardiographie stellt die Myokardstruktur entlang einer manuell positionierten Ultraschalllinie in einem definierten Zeitintervall dar und wird für die lineare Ausmessung der Herzdurchmesser verwendet (siehe 2.4.6.2). Die Betrachtung von nur einer Achse ist eine Limitation dieses Verfahrens, da insbesondere infolge eines MI lokalisierte Wandbewegungsstörungen auftreten, die durch das begrenzte Untersuchungsfenster übersehen werden. Um klinische Informationen über die (pathophysiologisch veränderte) Herzleistung zu erhalten, setzt die moderne Echokardiographie v. a. auf zwei- und dreidimensionale Ultraschalltechniken wie z. B. das *Speckle Tracking* (Mondillo et al. 2011; Sitia et al. 2010). Für eine effiziente Pumpaktion am Herzen liegen die Muskelfasern unterschiedlich angeordnet vor und erzeugen bei Myokardkontraktion eine longitudinale, eine radiale und eine zirkumferentielle Verkürzung des Herzens. Im Gegensatz zur traditionellen M-Mode-Methode ist die ST-basierte Echokardiographie in der Lage, diese hochkomplexe Myokarddeformation zu erfassen (Tee et al. 2015). Die myokardiale Verformung wird mithilfe der dimensionslosen Größe „Dehnung“ (strain  $\epsilon$ ) untersucht, die durch das *Tracking* (Erfassung der Distanz und der Geschwindigkeit) des Echosignals (*speckles*) berechnet wird.

Zur Beurteilung der linksventrikulären systolischen Funktion hat sich die Bewertung der EF etabliert. Unter Isofluran-narkotisierten Bedingungen ohne vorangegangene technische Manipulation der Herzfunktion liegt dieser Parameter bei ca. 60 % im Mausmodell (Bauer et al. 2011; Heinen et al. 2019; Walsh-Wilkinson et al. 2021). Beide im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten echokardiographischen Analysestrategien (siehe 3.13.3 und 3.13.4) bestätigten eine intakte linksventrikuläre Herzfunktion in der CM Slack CTR (M-Mode:  $59,09 \pm 1,88$  %, STE:  $58,14 \pm 1,98$  %) und im CM Slack KO (M-Mode:  $56,24 \pm 1,34$  %, STE:  $56,43 \pm 1,78$  %). Ein zweiter, der EF untergeordneter Parameter ist die FS, die die prozentuale Änderung des linksventrikulären Durchmessers während der Systole angibt. Auch diese Größe zeigte sich intakt und identisch groß an gesunden Herzen von CM Slack CTR- (M-Mode:  $30,96 \pm 1,33$  %, STE:  $29,10 \pm 2,33$  %) und CM Slack KO-Mäusen (M-Mode:  $29,09 \pm 0,87$  %, STE:  $29,07 \pm 1,79$  %). Die konventionelle M-Mode-Echokardiographie beruht auf der Annahme, dass eine absolute linksventrikuläre Geometrie vorliegt und berücksichtigt keine regionalen Unterschiede in der kontraktiven Funktion (Bhan et al. 2014; Krenning et al. 2003; Rutledge et al. 2020). Dieser ideale Zustand trifft zumeist auf ein gesundes Herz zu, das dynamisch und unter symmetrischer Wandbewegung kontrahiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die M-Mode-Analyse der STE-basierten Analyse also zunächst nicht unterlegen und beide Techniken bestätigen einen intakten Phänotyp unabhängig der kardiomyozytären Slack-Deletion.

Nach einem MI oder weiteren pathophysiologischen Ereignissen am Herzen ist die ventrikuläre Symmetrie oftmals gestört. Es ist daher nachvollziehbar, dass M-Mode-detektierbare Veränderungen der linksventrikulären Struktur und der globalen Funktion späte Manifestationen einer Erkrankung sind (Bauer et al. 2011). Häufig mangelt es der konventionellen Echokardiographie an Sensitivität, eine pathophysiologische Entwicklung am Herzen frühzeitig zu detektieren. Die STE ist dagegen ein geeignetes sensitiveres Verfahren, um frühe Veränderungen zu detektieren (Beyhoff et al. 2017; Stanton et al. 2009) oder feine Unterschiede in Abhängigkeit einer Genmanipulation im Mausmodell zu identifizieren (Chowdhury et al. 2020; Frankenreiter et al. 2017). Zunächst bestätigten die echokardiographischen Analysen eine signifikante Verschlechterung der globalen Herzfunktion in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach Durchführung des chronischen MI-Modells. Die anatomische Vergrößerung der M-Mode-detektierten LVID (Abb. 3.25 D, F) korrelieren mit der absoluten Herzgewicht-Zunahme nach I/R<sub>4Wochen</sub> (Abb. 3.23) und werden ergänzt durch die erhöhten Ventrikelvolumina ESV und EDV (Abb. 3.26 B, C) der ST-basierten B-Mode-Analyse. Das SV (Abb. 3.26 D) als Differenz der Füllungsstände in der Endsystole und Enddiastole demonstrierte einen signifikanten Unterschied zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen infolge I/R<sub>4Wochen</sub>. Im Gegensatz zur M-Mode-Analyse identifizierte die ST-basierte Auswertmethode (Abb. 2.8 und Abb. 3.26 F) auch ein zusätzliches Genotyp-abhängiges Defizit in der EF von CM Slack KO-Mäusen (M-Mode:  $34,34 \pm 2,48$  %; STE:  $33,33 \pm 2,13$  %) gegenüber den CM Slack CTR-Tieren (M-Mode:  $39,27 \pm 1,74$  %; STE:  $42,80 \pm 1,81$  %) nach I/R<sub>4Wochen</sub>. In Übereinstimmung dazu zeigte sich die GLS in Abb. 3.26 I signifikant verschlechtert im CM Slack KO ( $-7,50 \pm 0,68$  %) gegenüber der CM Slack CTR ( $-13,28 \pm 0,58$  %). Dieser Parameter gibt Auskunft über die longitudinale Verkürzungskapazität des Myokards innerhalb einer Herzaktion und gilt als früher Marker einer gestörten Herzfunktion, der oftmals vor der Verschlechterung konventioneller Parameter wie der EF und FS erkennbar wird (Bauer et al. 2011). Unter physiologischen Basalbedingungen liegt die GLS in der Regel  $< -15$  % (Bauer et al. 2011; Beyhoff et al. 2017; Tee et al. 2015). Dieser Normbereich trifft auch für die hier untersuchten Genotypen zu (Abb. 3.17 I) (CM Slack CTR:  $-17,54 \pm 1,07$  %; CM Slack KO:  $-16,77 \pm 0,81$  %). Verschlechtert sich die Wandbeweglichkeit infolge eines pathophysiologischen Events, wie z. B. einem MI, identifizierten Bhan et al. eine signifikante Abnahme der GLS von ursprünglich  $-15$  % auf ca.  $-5$  % nach 4-wöchiger LCA-Ligatur an der Maus. Außerdem berichteten die Wissenschaftler von einer Abnahme der longitudinalen Verformung und Verformungsrate in allen sechs Segmenten des Myokards (Bhan et al. 2014). Das gleiche Phänomen (jedoch ohne einheitliche statistische Relevanz) demonstrierte die regionale Segmentanalyse an CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4Wochen</sub> (Abb. 3.28 A, C). Dabei scheint die longitudinale Verformungskapazität beider Genotypen in Abb. 3.28 A v. a. in den Apexregionen (posterior und anterior) beeinträchtigt zu sein (basal:  $< -20$  % vs. I/R<sub>4Wochen</sub>:  $\geq -15$  %). Statistisch erkennbare Unterschiede bzgl. der Lokalisation des Ventrikelfezits in den anterior mittleren und apikalen Herzregionen als Charakteristikum eines MI blieben jedoch aus (Bauer et al. 2011; Bhan et al. 2014). Ursächlich dafür ist vermutlich das milde I/R-Protokoll und die Variabilität der regionalen Dysfunktion in den verschiedenen Herzen derselben Genotypen. Durch Zusammenfassung der regionalen Einzeldaten folgten die Darstellungen

der mittleren longitudinalen Verformung (Abb. 3.28 B) und der mittleren longitudinalen Verformungsrate (Abb. 3.28 D), die erneut einen signifikanten Funktionsverlust in Abhängigkeit des Behandlungsregimes und der Slack-Expression bestätigten. Insbesondere die abnormen Wandbewegungen und die positive Verformung während der Herzschlagphase (Abb. 3.27 D) tragen zu den ausgeprägten mittleren Defiziten von CM Slack KO bei. Ohne Auffälligkeit zeigte sich die longitudinale Verformungsgeschwindigkeit (Abb. 3.28 E, F), weshalb eine Störung des Reizleitungssystems am Herzen und ein Slack-abhängiger neuronaler Effekt zunächst ausgeschlossen werden können. Auch die radiale Verformungsdynamik (Abb. 3.28 G - I) demonstrierte negative Veränderungen durch den pathophysiologischen Stimulus am Herzen ohne Einflussnahme der kardiomyozytären Slack-Deletion. Weitere Auswertungen in der Kurzachse (*short axis view*, SAX) sind notwendig, um die Intaktheit der zirkumferentiellen Verkürzung zu bewerten.

Nachdem die konventionelle M-Mode-Methode zunächst keinen Unterschied im kardialen Phänotyp zwischen CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4Wochen</sub> identifizierte, zeigten sich in der ST-basierten Echokardiographie Slack-abhängige Effekte für den Erhalt der longitudinalen Deformationskapazität am Myokard. Es ist das Ziel zukünftiger Untersuchungen, die mögliche Bedeutung des Slack-Kanals in Bezug auf die Langzeitfolgen nach einem MI zu erarbeiten. Die technische Durchführung eines I/R-Modells größeren Schweregrads wird notwendig sein, um nekrotische Prozesse und ein effizientes kardiales *remodeling* anzustoßen. Da die Deletion des Slack-Kanals zu einer signifikant erhöhten Vulnerabilität im akuten MI-Modell führte, werden auch in einem geeigneten Langzeitmodell Slack-abhängige post-ischämische Veränderungen erwartet. Die bereits im Rahmen des hier gewählten I/R-Modells mittels STE sichtbar gewordenen Slack-abhängigen Effekte deuten auf eine funktionale Relevanz des kardiomyozytären Slack-Kanals für den Erhalt der linksventrikulären Funktion infolge eines MI hin.

#### 4.7 Limitationen und Ausblick auf zukünftige Experimente

Die aktuellen Befunde liefern vielversprechende Hinweise darauf, dass der kardiomyozytäre Slack-Kanal eine konservierte kardiale Funktion besitzt. Bislang ungeklärt ist der zugrundeliegende zelluläre Mechanismus, der das Herz Slack-abhängig im Rahmen pathophysiologischer Ereignisse vor übermäßigem Zelltod und funktionalen Defiziten schützt. Eine Limitation der aktuellen Studie ist der Mangel an selektiven Slack-Modulatoren. Die derzeit verfügbaren Pharmaka weisen entweder ein unspezifisches Wirkungsprofil hinsichtlich der K<sup>+</sup>-Kanäle auf oder modulieren weitere zelluläre Prozesse wie z. B. die ATP-Generierung (Chen et al. 2018b; Kaczmarek 2013). Um ein potentiell mechanistisches Zusammenspiel von Slack und mitoK<sub>ATP</sub> zu studieren, sind neben 5-HD weitere mitoK<sub>ATP</sub>-aktivierende Wirkstoffe wie Diazoxid einsetzbar (Paggio et al. 2019; Wojtovich et al. 2016). Sollte sich herausstellen, dass Slack übergeordneter Modulator einer intrazellulären Signalkaskade ist, die letztlich in die Aktivierung von mitoK<sub>ATP</sub> als Effektorprotein mündet, ist unter Einsatz von Diazoxid ein erhöhter Herzschutz unter Konditionierung in CM Slack KO-Mäusen zu erwarten.

Neben dem noch ausstehenden biochemischen Nachweis des Slack-Kanals in CM Slack-Mutanten sind elektrophysiologische Messungen an kultivierten Kardiomyozyten von großem

Interesse. Bislang fehlt eine direkte Demonstration der Na<sup>+</sup>-abhängigen Aktivierbarkeit des Slack-Kanals in den kardialen Primärzellen und im hier verwendeten heterologen System, den HEK293-hKCNT1-Zellen. Dieser funktionale Nachweis könnte durch graduelle Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration in der Dialyse-Lösung der Patch-Pipette erzeugt werden (Bhattacharjee et al. 2003). Um die Na<sup>+</sup>-Sensitivität des Kanals als Grundlage für den potentiell kardioprotektiven Mechanismus bei I/R zu diskutieren, sind [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Messungen unter pathophysiologischen Bedingungen in der Zelle essentiell. Ein hypoxischer/ischämischer Zustand könnte erzeugt werden, indem die Zielzellen (HEK293, Primärzellen, hiPS-CMs) in *live cell imaging chambers* einer Sauerstoff- und/oder Substratdeprivation ausgesetzt werden. Die anschließende Erfassung des [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Anstiegs (und auch [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) könnte auf Basis von Fluoreszenzmessungen mittels des membrangängigen, Na<sup>+</sup>-empfindlichen Indikatormoleküls SBFI (*sodium-binding benzofluran isophthalate*)-AM (Acetoxymethyl)-Ester (oder Fura-2,AM) erfolgen (Levi et al. 1994; Minta & Tsien 1989). Eine differenzierte Betrachtung zwischen dem zytoplasmatischen und mitochondrialen Na<sup>+</sup>-Gehalt der Zelle wäre durch den Einsatz von Fluoreszenz-basierten CoroNa-Indikatoren (CoroNa Green und CoroNa Red) möglich (Poburko et al. 2007). Für eine effektive Kanalaktivierung unter Hypoxie werden [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> von ca. 40 mM erwartet (Bhattacharjee et al. 2003).

Da sich die Deletion des Slack-Kanals als ursächlich für eine erhöhte Zelltoderate *in vitro* und *in vivo* herausstellte, ergibt sich *vice versa* die Frage, ob eine Überexpression des Kanals protektive Effekte bei Hypoxie bzw. Ischämie innehat. Um dies zu klären, könnte sich beispielsweise die von Quraishi, Kaczmarek et al. vorgestellte *gain-of-function* Mausmutante Slack<sup>+R455H</sup> eignen (Quraishi et al. 2020). Einen weiteren Grund diese Fragestellung zu bearbeiten, liefert die aktuelle klinische Datenlage, die einen Zusammenhang zwischen *gain-of-function*-Mutationen des Slack-Kanals und Epilepsie sowie chronischer Herzerkrankungen berichtet (Kohli et al. 2020). Diese Befunde sprechen zum einen für eine funktionale Relevanz des Slack-Kanals am humanen Herzen. Andererseits wird die Überlegung angestoßen, dass auch ein dauerhaft aktiver Slack-Kanal negative Effekte am Myokard provoziert (Kawasaki et al. 2017), sodass letztlich nur die gezielte Aktivierung im Rahmen eines pathophysiologischen Ereignisses beispielsweise eines MI einen kardioprotektiven Benefit bewirkt.

Zuletzt bietet sich für die Untersuchung Slack-abhängiger Langzeiteffekte ein I/R-Modell größeren Schweregrades (I<sub>45min</sub>/R<sub>4Wochen</sub>) (Heinen et al. 2019) oder ein permanentes LCA-Ligatur-Modell (Bhan et al. 2014) an, bei dem insbesondere die ischämische Myokardschädigung im Fokus steht. Für die anschließende Auswertung sollten klinische Parameter durch Verwendung von Echokardiographie, EKG und hämodynamischem Telemonitoring erhoben werden. Weitere Parameter, wie die Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt), könnten als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels (Bijnens et al. 2007) die kardiale Funktion des Slack-Kanals zusätzlich konkretisieren.

## 5 Zusammenfassung

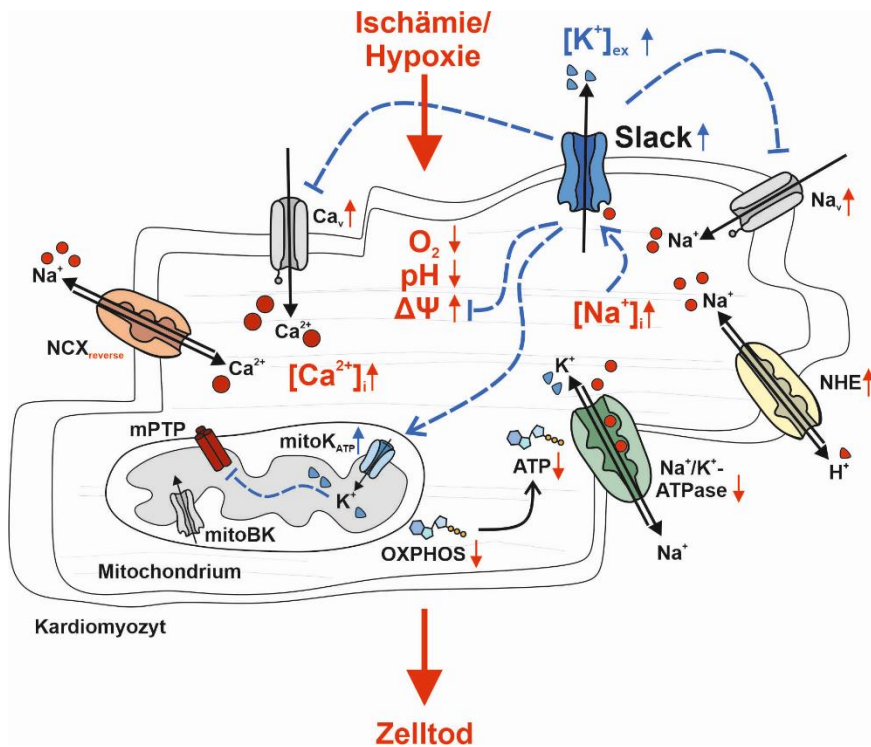
Der akute MI zählt zu den Hauptursachen für die Entstehung einer chronischen HI, die mit einer hohen Hospitalisierungsrate und Sterblichkeit einhergeht (Khan et al. 2020; Wilkins et al. 2017). Die klinische Datenlage veranschaulicht die Notwendigkeit für neue zusätzlich verfügbare Therapieansätze, um die I/R-induzierte Myokardschädigung zu mildern und einer post-ischämischen Umgestaltung der Herzen entgegenzuwirken. Aus diesem Grund ist die kardiovaskuläre Grundlagenforschung bestrebt, neue Zielstrukturen als mögliche Behandlungsstrategie eines akuten MI zu identifizieren. Gegenstand der hier vorliegenden Doktorarbeit ist entsprechend der Na<sup>+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanal Slack (*aka* Slo2.2, K<sub>Na</sub>1.1, KCNT1). Dieser gilt als vielversprechendes *target* unter ischämischen/hypoxischen Bedingungen. Seine Rolle am Herzen insbesondere den Kardiomyozyten in krankheitsrelevanten Herzinfarktmodellen *in vivo* ist dabei weitestgehend unklar.

Um diese übergeordneten Ziele und Fragen zu erreichen, wurden sowohl *in vivo* I/R-Modelle an globalen und Kardiomyozyten-spezifischen Kontroll- und Slack-defizienten Mäusen eingesetzt als auch *in vitro* Studien an kultivierten Kardiomyozyten von WT- und Slack KO-Tieren sowie an stabil-transfizierten HEK293-hKCNT1-Surrogatzellen durchgeführt. Obwohl Na<sup>+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>-Ströme erstmals an Kardiomyozyten des Meerschweinchens identifiziert wurden (Kameyama et al. 1984), liegt der Fokus der Slack-basierten Grundlagenforschung bislang in neuronalen Systemen (Kaczmarek 2013). Ein Grund hierfür könnte die geringe Expressionsdichte des Kanals im Herzen sowie ein Mangel an geeigneten, genetisch-definierten Tiermodellen zur Validierung seiner kardialen Funktionen sein. Entsprechend wurde die kardiale Proteinexpression von Slack sowie die myokardiale Funktion des Kanals lange Zeit kontrovers diskutiert (Joiner et al. 1998; Yuan et al. 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun durch Kombination biochemischer, elektrophysiologischer und neuentwickelter Fluoreszenz-basierter Untersuchungen die Expression eines funktionalen Slack-Kanals in murinen Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im pathophysiologischen Modell verursachte die Deletion des Slack-Kanals eine erhöhte Vulnerabilität in globalen und Kardiomyozyten-spezifischen Slack KO bei I/R *in vivo* und eine gesteigerte Zelltodrate Slack-defizienter Kardiomyozyten bei H/R *in vitro*. Bis *dato* war nur bekannt, dass der Nematode *C.elegans* nach Deletion des Säuger-orthologen *Slo2*-Gens hypersensitiv auf hypoxische Bedingungen reagiert (Yuan et al. 2003). Auf Basis dieser Befunde und der eigenen Arbeiten wurde die Hypothese entwickelt, dass die zytotoxische [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-Akkumulation im Ischämie-betroffenen Myokard ausschlaggebend für die gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit Na<sup>+</sup>-sensitiver Slack-Kanäle ist (Dryer 1994). Da im heterologen System eine EC<sub>50</sub> von 41 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> für die Slack-Aktivierung in symmetrischer K<sup>+</sup>-Lösung gemessen wurde (Bhattacharjee et al. 2003), ist in kardialen Primärzellen bei physiologischer [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (< 10 mM) (Murphy & Eisner 2009) zunächst von einer geringen endogenen Kanalaktivität auszugehen. Entsprechend zeigten globale und Kardiomyozyten-spezifische Slack KO-Mäuse unter physiologischen Bedingungen bezüglich HF, Blutdruck, Herzfunktion und Anatomie einen intakten (unauffälligen) kardiovaskulären Phänotyp. Slack-Aktivierung bei pathophysiologischer Na<sup>+</sup>-Akkumulation beispielsweise induziert durch myokardialen I/R-Schaden könnte jedoch durch den entstehenden K<sup>+</sup>-Efflux eine protektive Re- und Hyperpolarisation der Zellmembran

bewirken und somit zu einer Stabilisierung des Membranpotentials und damit zu einer Reduktion des zellulären Schadens beitragen. FRET-basierte  $K^+$ -Messungen an WT- und Slack KO-Kardiomyozyten sowie an hKCNT1-positiven und -negativen HEK293-Surrogatzellen mittels der  $K^+$ -Biosensoren GEPIIs bestätigten eine an Slack-gekoppelte transmembranäre  $K^+$ -Dynamik. Dabei führte die pharmakologische Aktivierung des Slack-Kanals zu einem ausgeprägten  $K^+$ -Efflux und zeitgleich zu einer deutlichen Verschiebung des Membranpotentials.

Interessanterweise impliziert die Analyse von Slo2-defizienten Nematoden, dass der Säuger-orthologe Slo2-Kanal auch Mediator des APC ist (Wojtovich et al. 2011). Im murinen Modell scheint dabei die *ex vivo* durch APC-induzierte Kardioprotektion ausschließlich Slick- und nicht Slack-abhängig zu verlaufen (Wojtovich et al. 2016). Die vorliegenden Versuche zur kardialen I/R *in vivo* bestätigten diesen Befund, entsprechend war die infarktlimitierende Wirkung der APC unabhängig vom Slack-Status, d. h. in WT- und globalen Slack KO-Mäusen signifikant und es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Im Gegensatz dazu führte die Deletion des Slack-Kanals zu einer reduzierten Kardioprotektion infolge mechanischer Präkonditionierung in globalen Slack KO- und CM Slack KO-Mäusen. Als pharmakologischer Ansatz des Herzschutzes bei I/R bzw. MI wurde die GC/cGMP/cGKI-Signalkaskade mittels des GC-Aktivators Cinaciguat stimuliert, was Slack-unabhängig zu einer Reduktion der Infarktareale führte. Hingegen führte die pharmakologische  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Inhibition mittels 5-HD ausschließlich in CM Slack CTR zu einem Verlust der iPre-induzierten Kardioprotektion. Dies impliziert, dass Slack möglicherweise zur Aktivierung von  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  am Mitochondrium und somit zur kardioprotektiven Signaltransduktion bei I/R beiträgt. Im Langezeitmodell nach I/R<sub>4Wochen</sub> waren der linksventrikuläre Funktionserhalt und die longitudinale Dehnungskapazität im CM Slack KO stärker beeinträchtigt als in CM Slack CTR-Herzen.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die hier vorliegenden Ergebnisse erstmals eine bedeutende Rolle des Slack-Kanals bei I/R am Herzen bestätigen. Die Deletion des kardiomyozytär exprimierten Slack-Kanals zeigte sich verantwortlich für ein übermäßiges Infarktgeschehen und ein Versagen kardioprotektiver Strategien was letztlich auch die linksventrikuläre Herzfunktion infolge eines MI negativ beeinflusst. Weitere Untersuchungen sind jedoch noch notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu entschlüsseln. Die aktuelle Datenlage erlaubt die Hypothese (Abb. 5.1), dass der Slack-Kanal im Kardiomyozyt nach pathophysiologischer Aktivierung unter kardialer Ischämie (i) zu einem  $K^+$ -Efflux, d. h. zu einer Re- und Hyperpolarisation der Plasmamembran und somit zu einer Membranstabilisierung der Zelle führt. Zudem scheint Slack (ii) an einer zellulären Signaltransduktion und Wechselwirkung mit  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  beteiligt zu sein, die zu einer Schadensprävention bei Konditionierung beiträgt.



**Abb. 5.1 Hypothese der kardioprotektiven Aktion des Slack-Kanals bei Ischämie/Hypoxie**

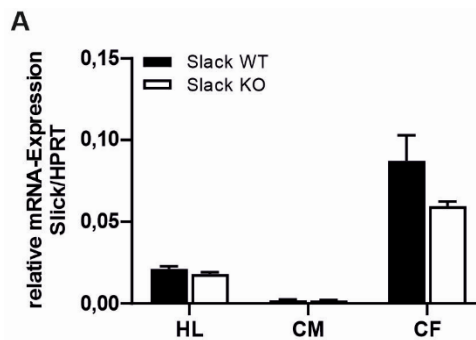
Schematische Darstellung der kardiotoxischen Ereignisse (rote Pfeile) während Ischämie/Hypoxie. Infolge der intrazellulären  $O_2$ - (und Substrat-) Deprivation, pH- und Membranpotential-Verschiebung (weniger negativ) werden Zelltod-stimulierende Prozesse in Kardiomyozyten aktiviert. Die zytotoxische  $[Na^+]_i$  und  $[Ca^{2+}]_i$ -Akkumulation resultieren u. a. durch den Funktionsverlust der  $Na^+/K^+$ -ATPase sowie der Aktivität des  $Na^+/H^+$ -Austauschers (NHE) und spannungssensitiver  $Na^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Kanäle ( $Na_v$ ,  $Ca_v$ ). Auch die Tätigkeit des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers (NCX) in *reverse*-Konfiguration ( $Ca^{2+}$ -Influx,  $Na^+$ -Efflux) treibt die zelltoxischen Prozesse weiter voran.

Im Rahmen eines akuten MI ist die Aktivierung des Plasmamembran-lokalisiereten Slack-Kanals (blau) infolge des übermäßigen  $[Na^+]_i$ -Anstiegs denkbar. Der resultierende  $K^+$ -Efflux könnte der Kationen-provozierten positiven Potentialverschiebung im Kardiomyozyt entgegenwirken und durch eine Re- und Hyperpolarisation zu einer Stabilisierung des Membranpotentials und Erhalt der zellulären Integrität beitragen. Über einen bislang ungeklärten Mechanismus könnte Slack zudem an einer iPre-ähnlichen intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sein und durch Interaktion mit  $mitoK_{ATP}$  am Mitochondrium zu einer protektiven Signaltransduktion (z. B. Inhibition der mPTP-Öffnung) beitragen.

$[K^+]_{ex}$ : extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration;  $[Ca^{2+}]_i$ : intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration;  $[Na^+]_i$ : intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration, ATP: Adenosinriphosphat,  $Ca_v$ : spannungssensitive  $Ca^{2+}$ -Kanäle,  $mitoBK$ : mitochondrialer  $Ca^{2+}$ -sensitiver  $K^+$  Kanal mit großer Leitfähigkeit;  $mitoK_{ATP}$ : mitochondrialer ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanal; mPTP: mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore;  $Na_v$ : spannungssensitiver  $Na^+$ -Kanal; NCX:  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers, NHE:  $Na^+/H^+$ -Austauschers, OXPHOS: oxidative Phosphorylierung,  $\Delta\Psi$ : Membranpotential. Zur Erstellung der Illustration wurden Abbildungsvorlagen von *Smart Medical Art* ([smart.sevier.com](http://smart.sevier.com)) und *BioRender* ([biorender.com](http://biorender.com)) verwendet.

## 6 Appendix

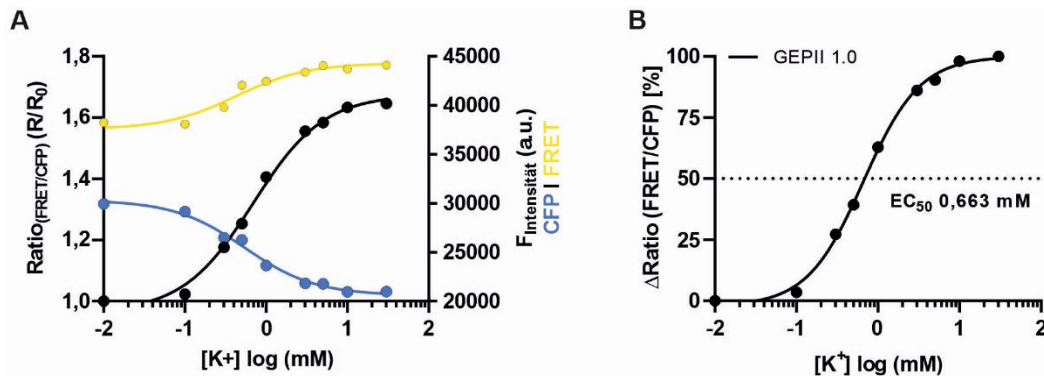
### 6.1 Kardiale Slick mRNA-Expressionsanalyse



**Abb. 6.1 mRNA-Expressionsanalyse des Slick-Kanals im Herzen und kardialen Zellen**

Relative Slick-mRNA-Expressionslevel bezogen auf HPRT in Gesamtherzen (Herzlysat, HL), in isolierten Kardiomyozyten (CM) und in isolierten kardialen Fibroblasten (CF). Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen WT und Slack KO-Proben. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{WT}$ : 4 - 11 Isolationen und  $n_{Slack\ KO}$ : 3 - 11 Isolationen.

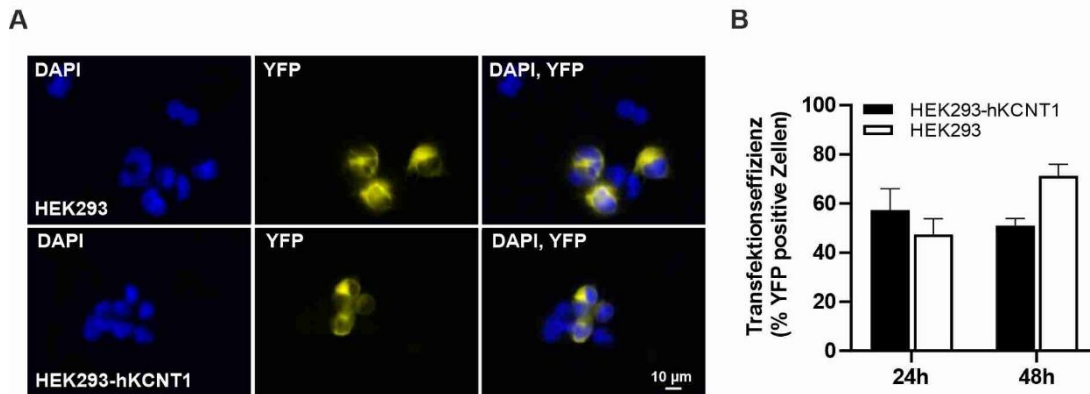
### 6.2 Charakterisierung und Funktionsanalyse des rekombinanten Sensors GEPII 1.0



**Abb. 6.2 Erfassung der K<sup>+</sup>-Sensitivität des rekombinanten Sensors GEPII 1.0**

(A) Repräsentativer Kurvenverlauf im zellfreien assay mit gradueller Zunahme der K<sup>+</sup>-Konzentration von 0,01 mM bis 30 mM. Der sigmoidale Verlauf des rekombinanten GEPII 1.0-vermittelten FRET Ratio-Signals (schwarze Kurve) resultiert aus dem ratiometrischen Verhalten der Fluoreszenz-Signale CFP (blaue Kurve) und FRET (gelbe Kurve). (B) Erfassung des EC<sub>50</sub>-Werts von 0,663 mM K<sup>+</sup> für GEPII 1.0 nach prozentualer Normierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Werte. Die Daten wurden zusammen mit Annika Luczak im Rahmen ihrer Masterarbeit generiert.

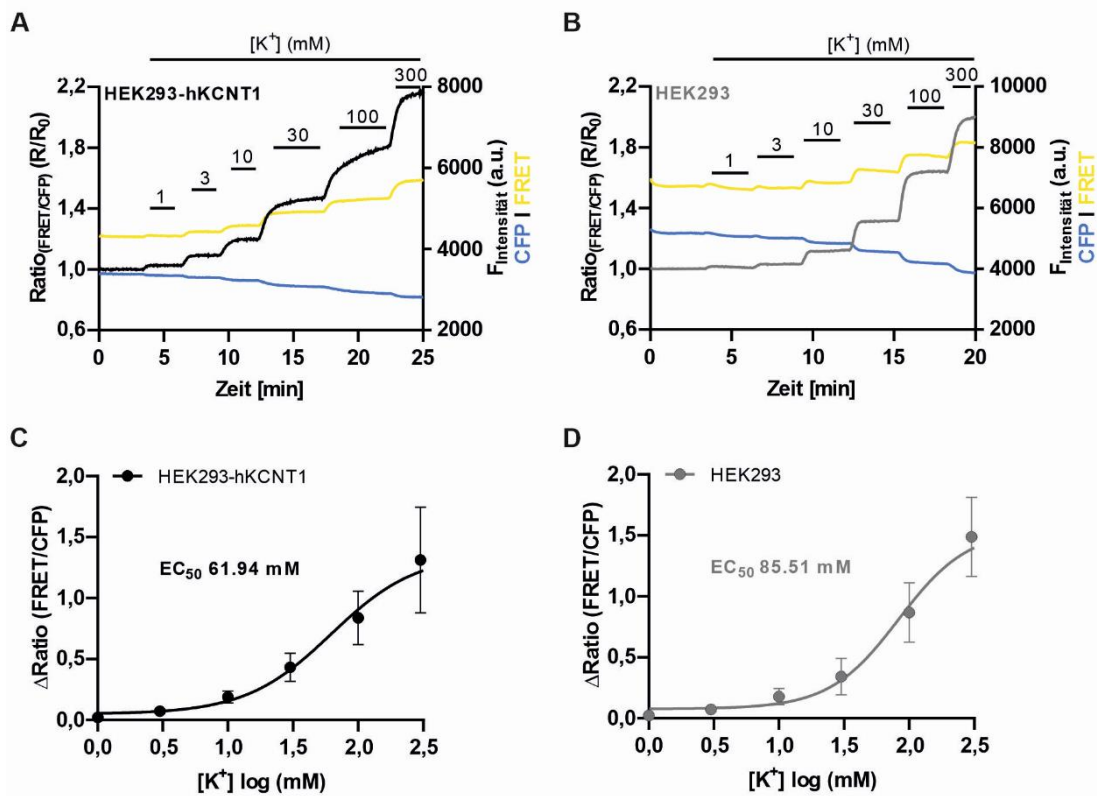
### 6.3 Zytoplasmatische Expression des Sensors NES I $\alpha$ -LysM GEPII 1.0 durch Transfektion von HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen



**Abb. 6.3 Ermittlung der Transfektionseffizienz in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen**

**(A)** Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen nach erfolgter Transfektion und Sensorexpression NES I $\alpha$ -LysM GEPII 1.0. Erfolgreich transfizierte Zellen erscheinen gelb fluoreszierend (YFP) durch Anregung des Sensor-gekoppelten Fluorophors cpV. Zellkerne sind durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI in blau gezeigt. **(B)** Quantitative Erfassung der Transfektionseffizienz von HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen nach 24 h bzw. 48 h Kultivierungszeit. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{HEK293-hKCNT1}}$ : 3 und  $n_{\text{HEK293}}$ : 6 für beide Zeitintervalle. Die Daten wurden zusammen mit Sophia Schanz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.

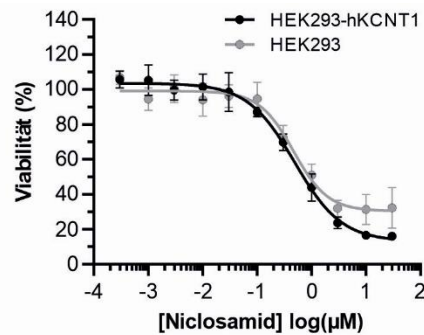
## 6.4 Untersuchungen zur Funktionalität des K<sup>+</sup>-Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Zellen



**Abb. 6.4** *In vitro* Charakterisierung des Sensors NES Ic-LysM GEPII 1.0 in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen

Repräsentative Kurvenverläufe der Fluoreszenzintensitäten von CFP (blaue Kurve) und FRET (gelbe Kurve) sowie der FRET Ratio-Signale in HEK293-hKCNT1 (schwarze Kurve) **(A)** und HEK293-Kontrollzellen (graue Kurve) **(B)** nach Transfektion mit Ic-LysM GEPII 1.0. Die Sensor-exprimierenden Zellen wurden vor der  $[\text{K}^+]_i$ -Messung mit Gramicidin permeabilisiert und zunehmender  $[\text{K}^+]_{\text{ex}}$  von 1 mM bis 300 mM ausgesetzt. In Abhängigkeit der  $[\text{K}^+]_i$ -Zunahme zeigte sich ein ratiometrischer Verlauf der Einzelintensitäten und eine proportionale Zunahme des FRET Ratio-Signals. Sigmoidaler Verlauf der  $\Delta\text{FRET}$  Ratio-Signale in HEK293-hKCNT1 **(C)** und HEK293-Kontrollzellen **(D)**. Ermittlung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte für NES Ic-LysM GEPII 1.0 in beiden Zellsystemen HEK293-hKCNT1 (61,94 mM) und HEK293 (85,51 mM). Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{\text{HEK293-hKCNT1}}$ : 38 Zellen (2 Präparationen) und  $n_{\text{HEK293}}$ : 35 Zellen (3 Präparationen). Die Daten wurden zusammen mit Sophia Schanz im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.

## 6.5 Slack-unabhängige Modulation der Viabilität durch Niclosamid



**Abb. 6.5 Untersuchungen zur Viabilität in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen nach Stimulation mit Niclosamid**

2(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Analyse zur Erfassung der Zytotoxizität von Niclosamid in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen. Erfassung der Zellviabilität (in %) nach Stimulation mit Niclosamid in aufsteigender Konzentration von 0,3 nM bis 30 µM für einen Zeitraum von 48 h. Es zeigte sich ein Dosis-abhängige Abnahme der Viabilität ohne Einflussnahme des Genotyps. Es sind die Mittelwerte ± SEM gezeigt mit  $n_{\text{HEK293-hKCNT1}}$ : 38 Zellen (2 Präparationen) und  $n_{\text{HEK293}}$ : 35 Zellen (3 Präparationen). Die Daten wurden von Dr. Helmut Bischof generiert.

## 6.6 Das Membranpotential definiert sich aus den Ionen-individuellen Nernstpotentialen der Zelle

Das Membranpotential der Zelle entsteht im Wesentlichen aus der Summe der Gleichgewichtspotentiale von  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ , die durch die Ionenpermeabilität plasmamembranständiger Ionenkanäle und die Aktivität elektrogener Pumpsysteme zustande kommen (Wright 2004). Zu den Transportsystemen zählen die  $Na^+/K^+$ -ATPase (Pivovarov et al. 2018), der NCX und die  $Ca^{2+}$ -ATPase (Brini & Carafoli 2011). Der chemische Gradient (die Konzentrationsdifferenz) bewirkt einen Ionenfluss, dem die Potentialdifferenz als elektrischer Gradient entgegenwirkt. Somit ist das Membranpotential ein elektrochemisches Gleichgewicht, bei dem der elektrische Gradient identisch groß und zum chemischen Gradienten entgegengesetzt gerichtet ist (Chrysafides et al. 2021). Jedes Ion besitzt ein individuelles Gleichgewichtspotential  $E_x$  (Nernstpotential, Umkehrpotential), das sich mithilfe der Nernstgleichung wie folgt berechnen lässt:

$$E_x = \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \log \frac{[x]_i}{[x]_{ex}}$$

### Formel 6.1 Die Nernstgleichung zur Berechnung des Gleichgewichtspotentials eines Ions

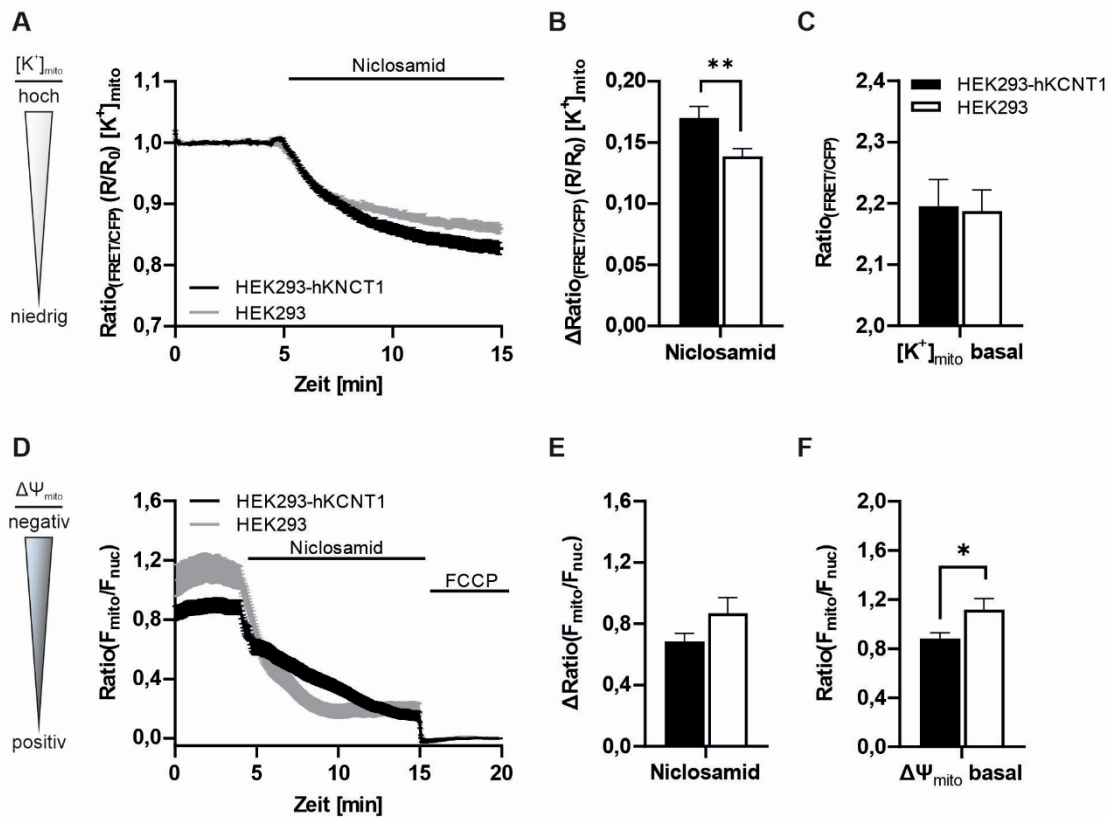
Das Gleichgewichtspotential ( $E_x$ ) eines Ions errechnet sich aus seiner Konzentrationsdifferenz ( $[x]_i$  vs.  $[x]_{ex}$ ) über die Membran.  $E_x$ : Nernstpotential,  $F$ : Faraday-Konstante (96485 J/V\* $\mu$ mol),  $n$ : Ionenwertigkeit,  $R$ : allgemeine Gaskonstante (8,31447 J/ml\*K),  $T$ : Temperatur,  $[x]_{ex}$ : extrazelluläre Ionenkonzentration;  $[x]_i$ : intrazelluläre Ionenkonzentration.

## 6.7 Adaptive Prozesse im mitochondrialen Ionenhaushalt infolge der Slack-Expression in HEK293-hKCNT1

Das Mitochondrium als Kraftwerk der Zelle ist von essentieller Bedeutung für zellulär oxidative Reaktionen und ATP-abhängige, energetische Prozesse (Alberts 2002; Maack & O'Rourke 2007). Neben diesen Aufgaben ist das Organell zudem involviert in einer Vielzahl zellulärer Signalwege fungierend als Kaskaden-initiiierende Plattform, Signal-übermittelnder Mitspieler oder Effektor-Einheit selbst (Tait & Green 2012). Unter Berücksichtigung des komplexen Zusammenspiels innerhalb der Zelle wurde der mitochondriale Status bezugnehmend auf die mitochondriale  $K^+$ -Homöostase ( $[K^+]_{\text{mito}}$ ) und das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ ) in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen untersucht (Abb. 6.6). Ersteres erfolgte durch Transfektion der Zellen mit dem  $K^+$ -Sensor mit NES Ic-LysM GEPII 1.0, der subzellulär und ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert war. Das  $\Delta\Psi_{\text{mito}}$  wurde durch Beladung der Zellen mit dem rot-orange fluoreszierenden Farbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat (TMRM) vermessen, das sich aufgrund seiner membranpermeablen, kationischen Eigenschaften in aktiven Mitochondrien anreichert.

Wie in Abb. 6.6 C erkennbar, zeigte sich unter Basalbedingungen kein Unterschied im  $K^+$ -Gehalt der Mitochondrien (HEK293-hKCNT1:  $2,20 \pm 0,04$ ; HEK293:  $2,19 \pm 0,03$ ). Als Antwort auf die Niclosamid-Stimulation resultierte jedoch ein stärkerer  $[K^+]_{\text{mito}}$ -Efflux in HEK293-hKCNT1-Zellen gegenüber den HEK293-Kontrollzellen (Abb. 6.6 A, B) (HEK293-hKCNT1:  $0,17 \pm 0,01$ ; HEK293:  $0,14 \pm 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Dies kann als sekundärer Effekt, ausgelöst durch den verstärkt auftretenden zytoplasmatischen  $[K^+]_i$ -Efflux in den Slack-exprimierenden HEK293-hKCNT1-Zellen (Abb. 3.8 B), interpretiert werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass auch das basale  $\Delta\Psi_{\text{mito}}$  in HEK293-hKCNT1-Zellen signifikant reduziert war (Abb. 6.6 D, F) und sich analog zu dem bereits beobachteten, weniger polarisierten Plasmamembranpotential ( $\Delta\Psi$ ) (Abb. 3.9 C) und  $[K^+]_i$ -Gehalt (Abb. 3.7 C) in der Gesamtzelle verhielt (HEK293-hKCNT1:  $0,882 \pm 0,047$ ; HEK293:  $1,117 \pm 0,091$ ; \*  $p < 0,05$ ). Die Stimulation mit dem Slack-Aktivator Niclosamid bewirkte trotz eines signifikant höheren  $[K^+]_{\text{mito}}$ -Ausstroms (Abb. 6.6 B) eine statistisch unauffällige und somit Slack-unabhängige Verschiebung des  $\Delta\Psi_{\text{mito}}$  in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen (Abb. 6.6 D, E) (HEK293-hKCNT1:  $0,685 \pm 0,053$ ; HEK293:  $0,868 \pm 0,103$ ). Dies spricht erneut für die Lokalisation des Slack-Kanals an der Plasmamembran und deutet auf einen primär regulatorischen Effekt dieses  $K^+$ -Kanals auf zellulärer bzw. zytoplasmatischer Ebene hin.

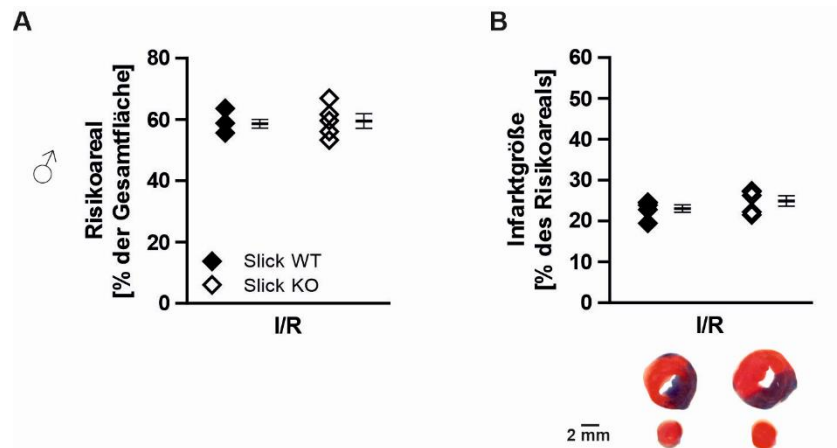


**Abb. 6.6 Untersuchung des  $[K^+]_{mito}$ -Haushalts und des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta\Psi_{mito}$  in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen**

**A)** FRET-basierte  $[K^+]_{mito}$  Messung in HEK293-hKCNT1- (schwarze Kurve) und HEK293-Kontrollzellen (graue Kurve) nach Expression des mitochondrialen Sensors mit Ic-LysM GEPII 1.0 unter Basalbedingungen und nach Applikation von Niclosamid. **(B)** Die Quantifizierung der  $\Delta$ FRET Ratio-Werte nach Niclosamid-Stimulation zeigte eine signifikant größere  $[K^+]_{mito}$ -Reduktion in HEK293-hKCNT1- gegenüber den HEK293-Kontrollzellen. **(C)** Unter Basalbedingungen zeigten sich keine Unterschiede in den Ratio-Werten der Genotypen. Es ist eine gleichverteilte  $[K^+]_{mito}$  in HEK293-hKCNT1- und HEK293-Kontrollzellen anzunehmen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n$ (HEK293-hKCNT1): 44 Zellen (5 Präparationen) und  $n$ (HEK293): 51 Zellen (6 Präparationen); \*\*  $p < 0,01$ .

**(D)** Fluoreszenzmessung in HEK293-hKCNT1- und HEK293-Kontrollzellen nach Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM unter Basalbedingungen und anschließender Stimulation mit Niclosamid. Das Protonophor FCCP diente zur vollständigen Depolarisation der Mitochondrien. **(E)** Quantitative Erfassung der  $\Delta$ Ratio ( $F_{mito}/F_{nuc}$ )-Werte nach Niclosamid-Stimulation in HEK293-hKCNT1 und HEK293-Kontrollzellen. Es zeigte sich kein Genotyp-spezifischer Unterschied in der  $\Delta\Psi_{mito}$ -Verschiebung. **(F)** Unter Basalbedingungen sind die Ratio-Werte (Ratio( $F_{mito}/F_{nuc}$ )) in HEK293-hKCNT1-Zellen signifikant reduziert gegenüber den HEK293-Kontrollzellen. Dies impliziert ein weniger polarisiertes  $\Delta\Psi_{mito}$  in Abhängigkeit der Slack-Expression und unter physiologischen Bedingungen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt mit  $n_{HEK293-hKCNT1}$ : 180 Zellen (6 Präparationen) und  $n_{HEK293}$ : 156 Zellen (5 Präparationen); \*  $p < 0,05$ . Die Daten wurden von Dr. Helmut Bischof generiert.

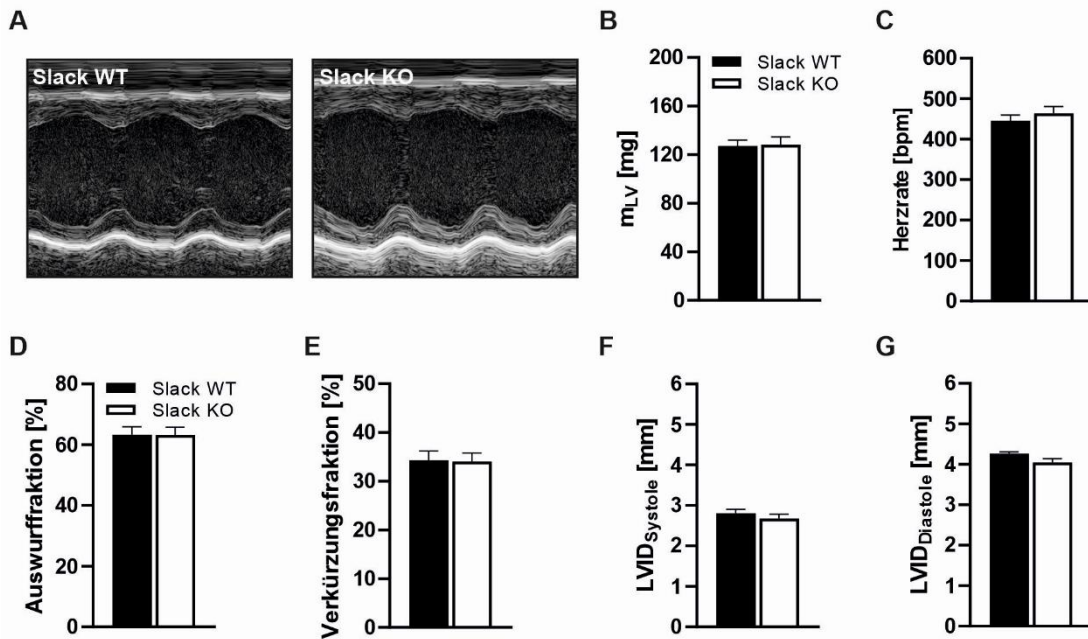
## 6.8 Slick KO-Mäuse zeigen eine normale Infarktgröße nach akutem Myokardinfarkt



**Abb. 6.7 Bestimmung der Infarktgröße nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion in WT- und globalen Slick KO-Hezen**

**(A)** Bestimmung des Risikoareals (% der Gesamtherzfläche) in WT- und Slick KO-Mäusen nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion. Der Kontrollparameter bestätigte ein stabiles Risikoareal bei ca. 60 % für beide Genotypen. **(B)** Die Infarktgröße (% des Risikoareals) zeigte keine Unterschiede zwischen WT und Slick KO-Mäusen. Die Deletion des Slick-Kanals führte zu keiner erhöhten Vulnerabilität nach I/R (30 min/120 min). Repräsentative Herzscheiben sind unterhalb des jeweiligen Genotyps dargestellt (blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß plus rot: Risikoareal (AAR)). Die Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte ± SEM mit  $n_{WT}$ : 5 Tiere,  $n_{Slick\ KO}$ : 5 Tiere.

## 6.9 Die globale Deletion des Slack-Kanals hat keinen Einfluss auf die physiologische, linksventrikuläre Herzfunktion

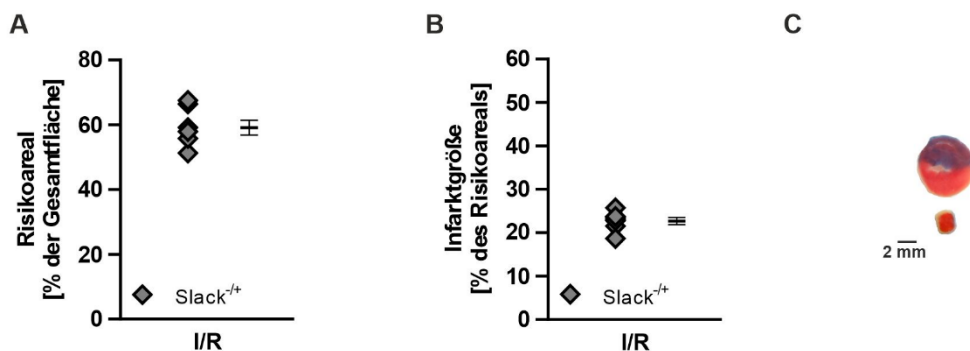


**Abb. 6.8 Erfassung der linksventrikulären Herzfunktion via konventioneller M-Mode-Echokardiographie in WT- und globalen Slack KO-Mäusen**

(A) Repräsentative M-Mode-Aufnahmen von WT- und Slack KO-Mäusen in PSLAX-Einstellung. Es zeigten sich zwischen den Genotypen keine Unterschiede in der linksventrikulären Masse (m<sub>LV</sub>) (B) noch den Innendurchmessern (LVID) während der Systole (F) und der Diastole (G). Die funktionalen Parameter Auswurfraction (D) und Verkürzungsfraction (E) bestätigten eine intakte Ventrikelaktivität unabhängig der Slack-Kanal-Expression. Die Messungen erfolgten bei einer stabilen Herzrate (C) > 400 bpm in WT und Slack KO. Es sind die Mittelwerte ± SEM mit n<sub>WT</sub>: 10 Tiere und n<sub>Slack KO</sub>: 9 Tiere gezeigt.

## 6.10 Die heterozygote Expression des Slack-Kanals hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße

Das Verpaarungsschema zur Generierung der CM Slack KO-Mausmutante ( $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$ ,  $\text{Slack}^{\text{fl}/-}$ ) sichert eine vollständige Deletion des Slack-Kanals im Kardiomyozyt, führt aber auch zu einem globalen, heterozygoten Genotyp. Um sicherzustellen, dass dies keinen Einfluss auf die Infarktgröße im akuten Infarktmodell *in vivo* hat, wurden heterozygote  $\text{Slack}^{\text{fl}/+}$ -Tiere dem identischen Protokoll ausgesetzt. Nach I/R zeigte sich eine deckungsgleiche Infarktgröße in  $\text{Slack}^{\text{fl}/+}$  ( $22,71 \pm 0,82$  %), die bereits in globalen WT ( $25,34 \pm 1,41$  %) beobachtet wurde. Eine Beeinträchtigung in der Kardiomyozyten-spezifischen Mutante ( $\alpha\text{MHC-Cre}^{\text{Tg}/+}$ ,  $\text{Slack}^{\text{fl}/-}$ ) infolge der heterozygoten globalen Slack-Expression ist somit ausgeschlossen.



**Abb. 6.9 Heterozygote Slack-Mäuse zeigen eine normale Infarktgröße nach akutem MI *in vivo***

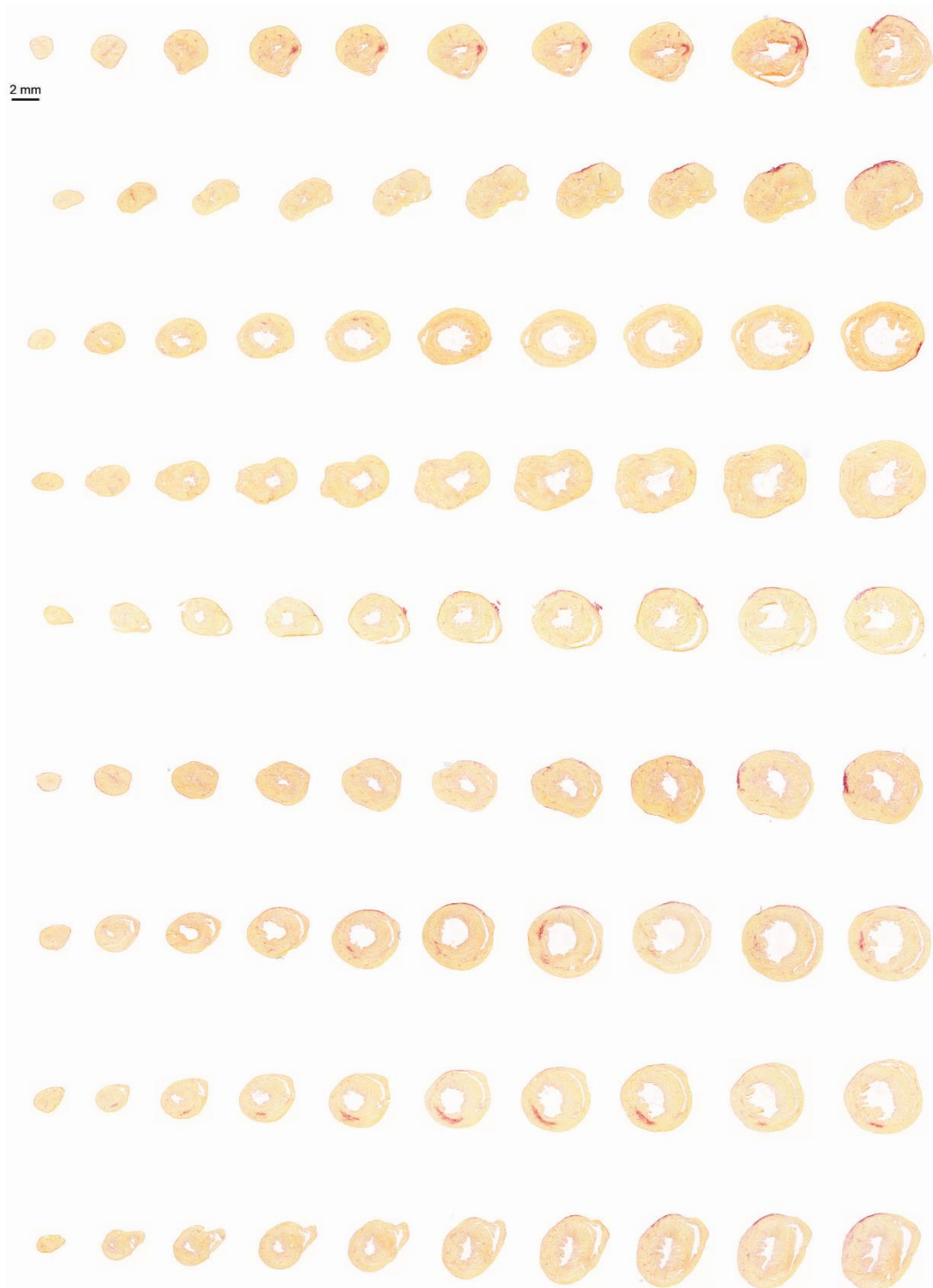
**(A)** Bestimmung des Risikoareals (% der Gesamtherzfläche) in globalen  $\text{Slack}^{\text{fl}/+}$ -Mäusen nach 30 min Ischämie und 120 min Reperfusion. Der Kontrollparameter bestätigte ein stabiles Risikoareal bei ca. 60 %. **(B)** Die Infarktgröße (% des Risikoareals) zeigte eine normale Größe von ca. 22 %. Die heterozygote Deletion des Slack-Kanals führte zu keiner erhöhten Vulnerabilität nach I/R (30 min/120 min). **(C)** Repräsentative Herzscheiben von  $\text{Slack}^{\text{fl}/+}$  nach Evans Blue- und TTC-Färbung: blau: nicht-betroffenes Areal (ANAR), weiß: nekrotisches Gewebe, rot: von dem Infarkt betroffenes aber intaktes Gewebe, weiß *plus* rot: Risikoareal (AAR). Die Rauten stellen einzelne Experimente dar. Balken zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n_{\text{Slack}^{\text{fl}/+}}$ : 7 Tiere.

## 6.11 Darstellung der fibrotischen Veränderung nach $\text{I/R}_{4\text{Wochen}}$ mittels

### Picro-Sirius-Rot-Färbung

In den beiden nachfolgenden Unterkapitel 6.11.1 und 6.11.2 werden die immunhistochemisch behandelten Herzen von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach  $\text{I/R}_{4\text{Wochen}}$  dargestellt.

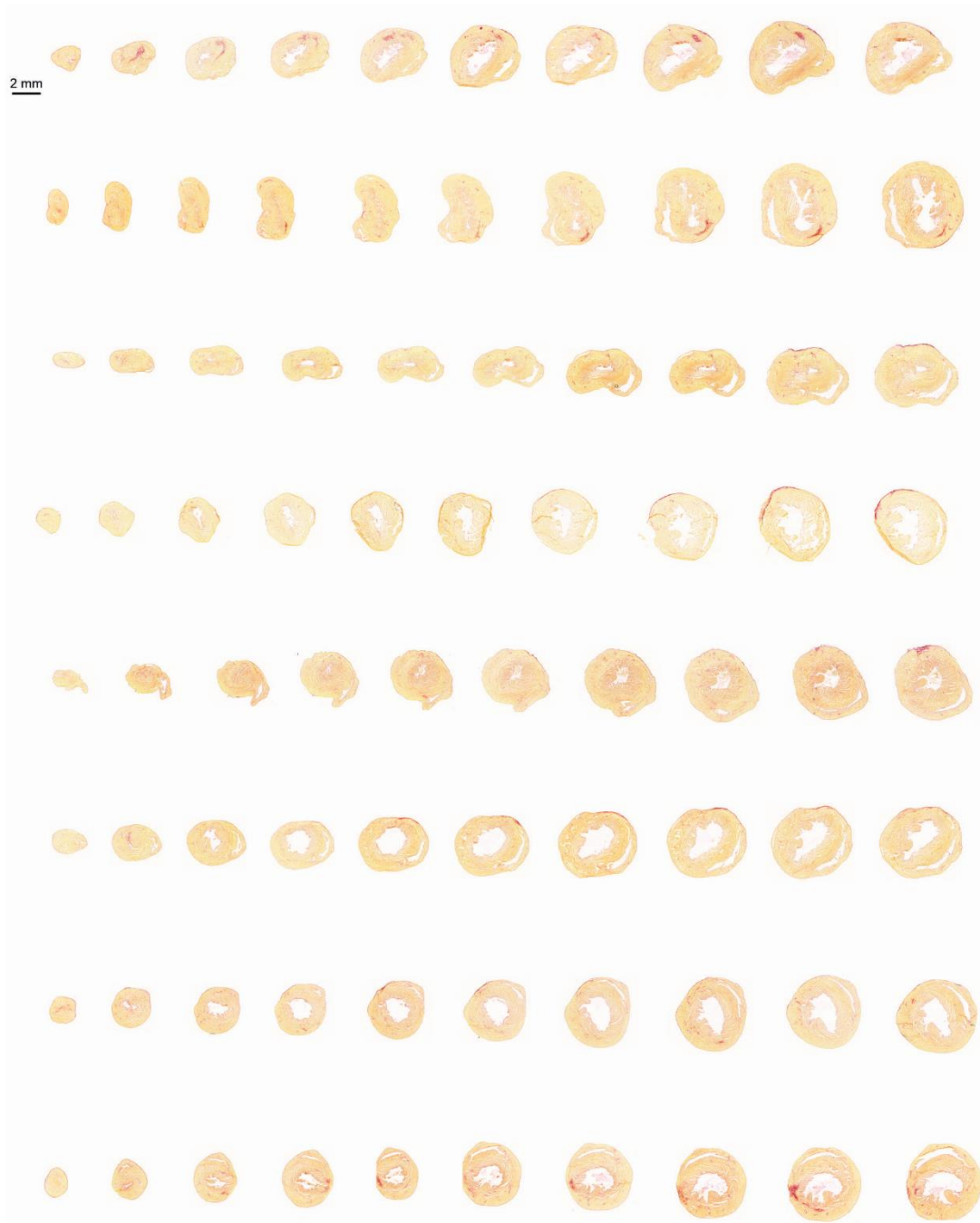
### 6.11.1 Fibroseentwicklung in CM Slack CTR-Herzen nach I/R<sub>4</sub>Wochen



**Abb. 6.10 Picro-Sirius-Rot-Färbung der CM Slack CTR-Herzen nach I/R<sub>4</sub>Wochen**

Darstellung aller statistisch berücksichtigter Herzscheiben nach Sirius Rot-Färbung von CM Slack CTR-Mäusen nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Rot-gefärbtes Areal visualisiert das fibrotische Gewebe. Pro Herz wurden 10 Areale (Apex bis Ligatur) zur Erfassung des Fibrosierungsgrads analysiert. n<sub>CM Slack CTR</sub>: 9 Herzen.

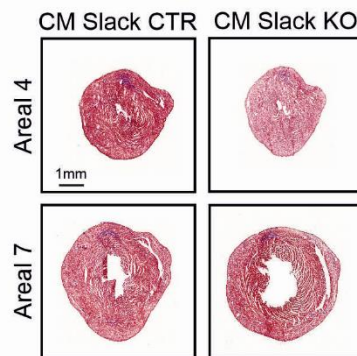
### 6.11.2 Fibroseentwicklung in CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4</sub>Wochen



**Abb. 6.11 Picro-Sirius-Rot-Färbung der CM Slack KO-Herzen nach I/R<sub>4</sub>Wochen**

Darstellung aller statistisch berücksichtigter Herzscheiben nach Picro-Sirius-Rot-Färbung von CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4</sub>Wochen. Rot-gefärbtes Areal visualisiert das fibrotische Gewebe. Pro Herz wurden 10 Areale (Apex bis Ligatur) zur Erfassung des Fibrosierungsgrads analysiert. n<sub>CM Slack KO</sub>: 8 Herzen.

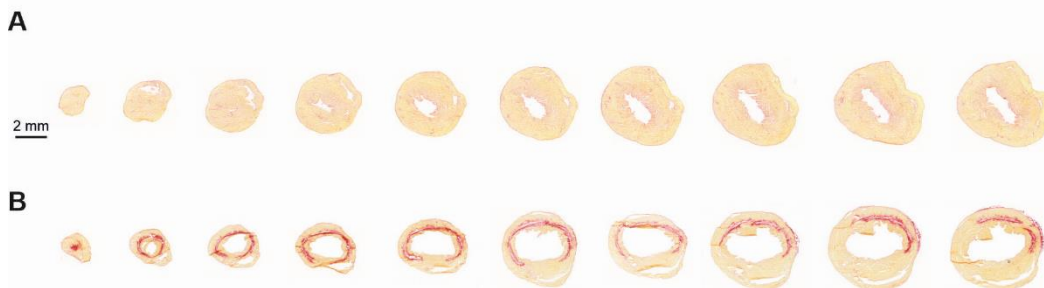
## 6.12 Repräsentative Darstellung der fibrotischen Veränderung nach I/R<sub>4Wochen</sub> mittels Masson Trichrom-Färbung



**Abb. 6.12** Darstellung fibrotischer Areale in I/R<sub>4Wochen</sub>-geschädigten Herzen mittels Masson Trichrom-Färbung

Repräsentative Herzscheiben von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen nach I/R<sub>4Wochen</sub>. Visualisierung des fibrotischen Gewebes (blau) mittels Masson Trichrom-Färbung. Es zeigte sich nur eine geringe Menge an Narbengewebe in den stichprobenartig gewählten Herzscheiben und bestätigte die Färberegebnisse der Sirius Rot-Färbung in Kapitel 3.13.2 bzw. 6.11. Die Farbdifferenzierung „rot vs. blau“ erwies sich undeutlicher als „rot vs. gelb“ nach erfolgter Sirius Rot-Färbung. Die statistische Analyse zur Erfassung des Fibrosierungsgrads beruht daher auf der zuletzt genannten Färbetechnik (siehe 3.13.2).

## 6.13 Fibroseentwicklung nach zeitlicher Modulation von Ischämie und Reperfusion im chronischen Infarktmodell



**Abb. 6.13** Picro-Sirius-Rot-Färbung von Kontrollherzen nach Anpassung der Zeitfenster von Ischämie und Reperfusion im chronischen Infarktmodell *in vivo*

**(A)** Darstellung repräsentativer WT-Kontrollherzareale nach 30 min Ischämie und 14 Tagen Reperfusion (I/R<sub>2Wochen</sub>) ohne augenscheinliche Fibroseentwicklung. **(B)** Darstellung repräsentativer WT-Kontrollareale nach 45 min Ischämie und 28 Tagen Reperfusion mit deutlich erkennbarer Fibrosierung. Das zweite Regime I<sub>45min</sub>/R<sub>4Wochen</sub> wurde durchgeführt von M.Sc. Cardiol. Jiaqi Yang.

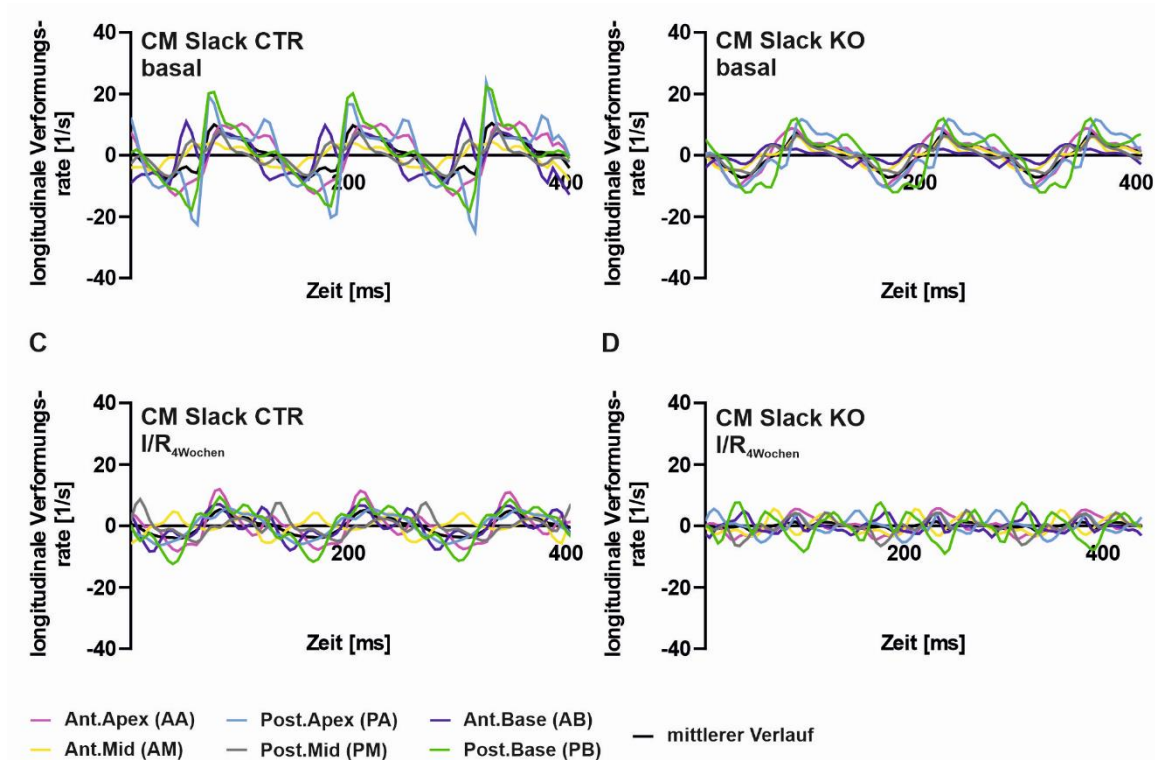
## 6.14 Tabellarische Gegenüberstellung der echokardiographisch erhobenen Daten in CM Slack CTR- und CM Slack KO-Mäusen

Untersuchung/ Parameter	CM Slack CTR basal	CM Slack KO basal	CM Slack CTR I/R <sub>4</sub> Wochen	CM Slack KO I/R <sub>4</sub> Wochen	Behandlung basal vs. I/R	Genotyp CTR vs. KO
KG [g]	27,47 ± 0,89	26,66 ± 0,54	28,15 ± 0,25	27,41 ± 0,41	ns	ns
HG [mg]	120,69 ± 3,55	119,57 ± 2,52	164,27 ± 4,65	162,85 ± 3,91	***	ns
Tibia [mm]	16,57 ± 0,16	16,54 ± 0,21	16,97 ± 0,25	16,91 ± 0,16	ns	ns
HG/KG [%]	0,44 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,60 ± 0,01	***	ns
HG/TL [mg/mm]	7,28 ± 0,19	7,23 ± 0,12	9,86 ± 0,32	10,03 ± 0,40	***	ns
<b>PSLAX, M-Mode</b>						
EF [%]	59,09 ± 1,88	56,24 ± 1,34	39,27 ± 1,74	34,34 ± 2,48	***	ns
FS [%]	30,96 ± 1,33	29,09 ± 0,87	19,10 ± 0,97	16,47 ± 1,30	***	ns
EDD [mm]	4,00 ± 0,12	4,13 ± 0,09	4,69 ± 0,07	4,83 ± 0,12	***	ns
ESD [mm]	2,80 ± 0,11	2,93 ± 0,08	3,80 ± 0,09	4,05 ± 0,16	***	ns
<b>PSLAX, STE<sub>global</sub></b>						
EF [%]	58,14 ± 1,98	56,43 ± 1,78	42,80 ± 1,81	33,33 ± 2,13	***	basal ns IR *
FS [%]	29,10 ± 2,33	29,07 ± 1,79	19,15 ± 1,25	15,48 ± 1,27	CTR ** KO ***	ns
Herzrate [bpm]	445,73 ± 23,24	408,10 ± 9,01	413,46 ± 7,98	432,34 ± 14,58	ns	ns
EDV [μl]	47,03 ± 2,63	48,06 ± 2,44	65,23 ± 3,03	60,85 ± 1,67	CTR *** KO *	ns
ESV [μl]	19,61 ± 1,60	20,87 ± 1,73	37,31 ± 2,56	39,30 ± 1,48	***	ns
SV [μl]	27,43 ± 1,55	27,17 ± 1,05	27,92 ± 1,38	21,30 ± 0,79	CTR ns KO *	basal ns IR **
CO [ml/min]	12,34 ± 1,15	10,81 ± 0,82	10,91 ± 0,35	9,18 ± 0,32	ns	ns
GLS [%]	-17,54 ± 1,07	-16,77 ± 0,81	-13,28 ± 0,58	-7,50 ± 0,68	CTR ** KO ***	basal ns IR ***
<b>PSLAX, STE<sub>regional</sub></b>						
Radiale Verformung [%]	31,26 ± 2,22	32,49 ± 2,06	20,84 ± 1,84	17,53 ± 1,97	CTR ** KO ***	ns
Radiale Verformungsrate [1/s]	7,01 ± 0,60	7,55 ± 0,39	5,19 ± 0,36	4,50 ± 0,48	KO ***	ns
Radiale Verformungsgeschwindigkeit [cm/s]	1,24 ± 0,10	1,20 ± 0,05	0,94 ± 0,06	0,78 ± 0,07	CTR * KO **	ns
Longitudinale Verformung [%]	-18,14 ± 1,20	-15,87 ± 1,02	-12,44 ± 0,68	-5,93 ± 0,89	***	basal ns IR ***
Longitudinale Verformungsrate [1/s]	-5,78 ± 0,37	-5,11 ± 0,53	-3,95 ± 0,28	-2,5 ± 0,28	CTR ** KO ***	basal ns IR *
Longitudinale Verformungsgeschw. [cm/s]	0,65 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,41 ± 0,04	ns	ns

CO: Herzzeitvolumen, EDD: Enddiastolischer Durchmesser, EDV: Enddiastolisches Volumen, EF: Auswurfraction, ESD: Endsystolischer Durchmesser, ESV: Endsystolisches Volumen, FS: Verkürzungsfraktion, GLS: Globale longitudinale Dehnung, HG: Herzgewicht, KG: Körpergewicht, PSLAX: Parasternale lange Achse, SV: Schlagvolumen, TL: Tibialänge

## 6.15 STE-basierte, radiale Betrachtung der Herzdynamik

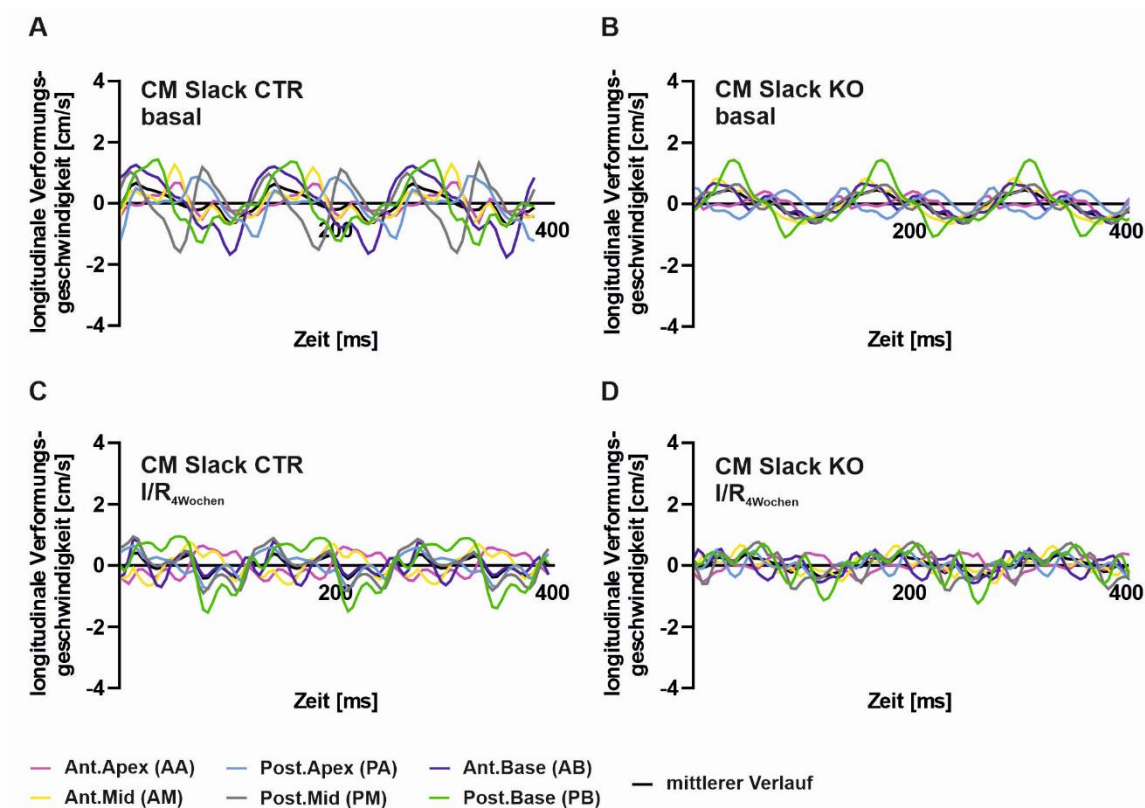
### 6.15.1 Exemplarische Darstellung der longitudinalen Verformungsrate von gesunden und post-I/R-Herzen



**Abb. 6.14 Longitudinale Verformungsrate des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der longitudinalen Verformungsrate [in 1/s] von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen (**A, B**) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (**C, D**) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die longitudinale Dehnung in Abhängigkeit der Zeit von einzelnen Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in schwarz gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertung generiert.

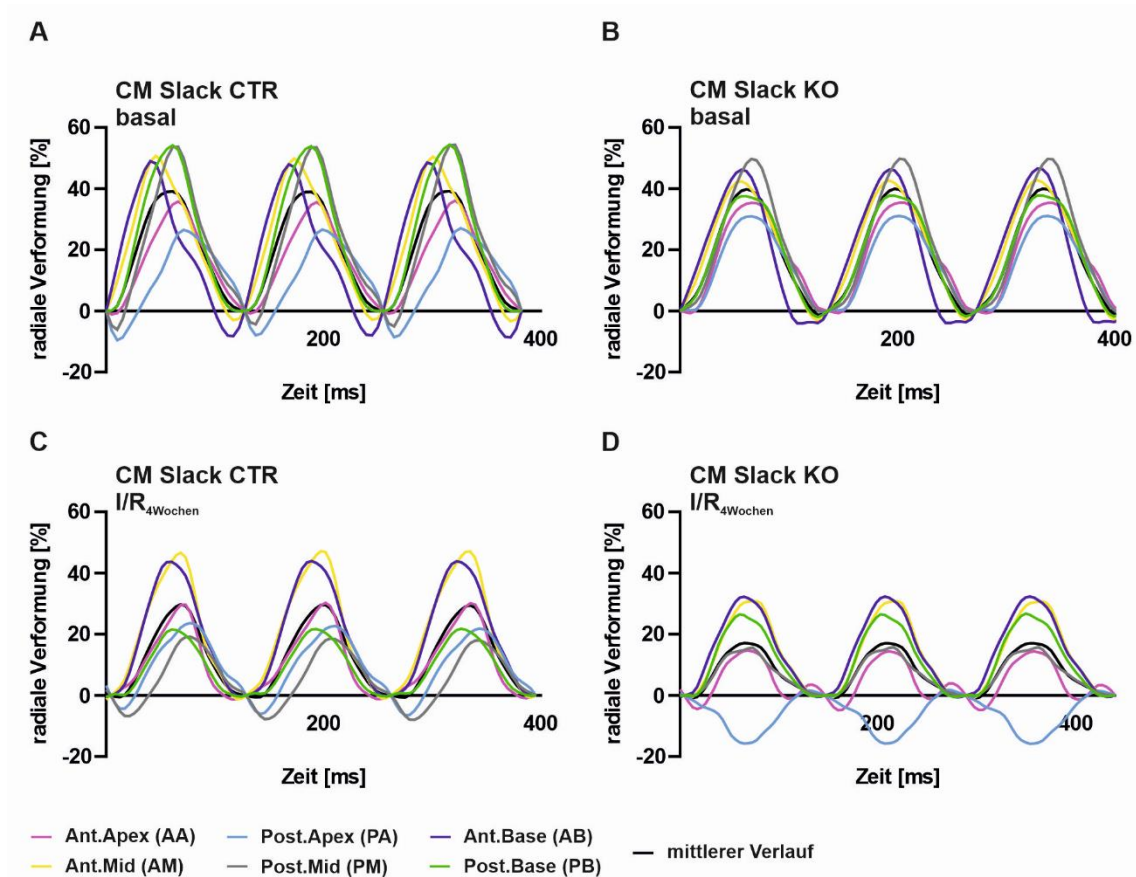
### 6.15.2 Exemplarische Darstellung der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit von gesunden und post-I/R-Herzen



**Abb. 6.15 Longitudinale Verformungsgeschwindigkeit des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der longitudinalen Verformungsgeschwindigkeit [in cm/s] von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen (**A, B**) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (**C, D**) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die Dynamik der einzelnen Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in schwarz gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertung generiert.

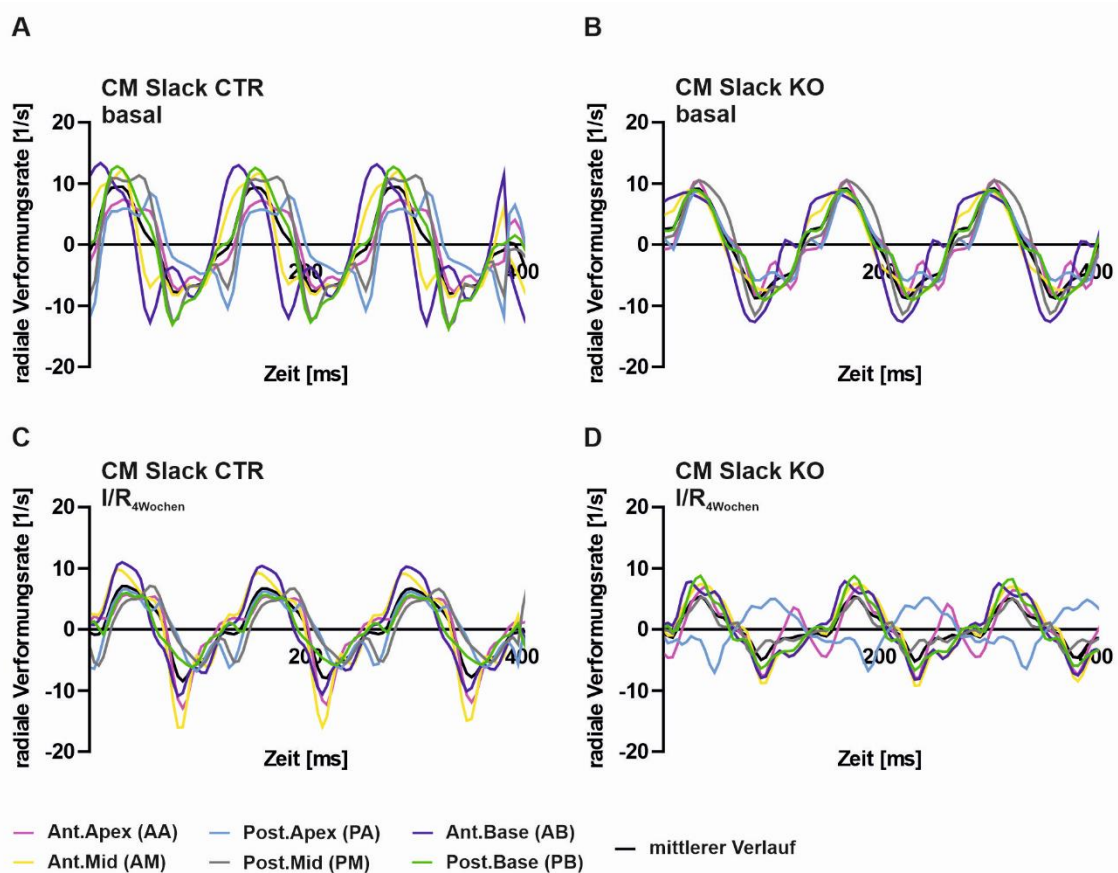
### 6.15.3 Exemplarische Darstellung der radialen Verformung von gesunden und post-I/R-Herzen



**Abb. 6.16 Radiale Verformung des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der radialen Verformung [in %] von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen (**A, B**) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (**C, D**) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die radiale Dehnung einzelner Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in schwarz gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertung generiert.

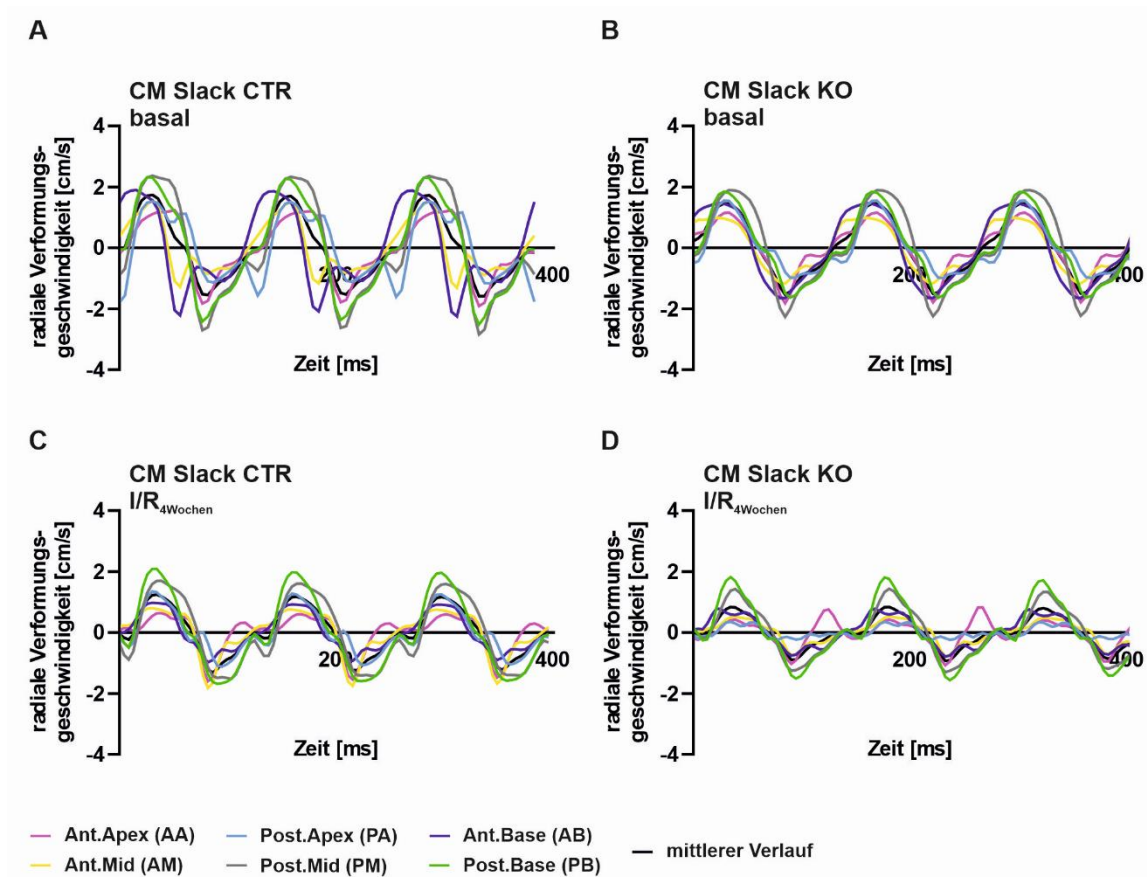
### 6.15.4 Exemplarische Darstellung der radialen Verformungsrate von gesunden und post-I/R-Herzen



**Abb. 6.17 Radiale Verformungsrate des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der radialen Verformungsrate [in 1/s] von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen (**A, B**) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (**C, D**) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die radiale Dehnung in Abhängigkeit der Zeit von einzelnen Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in schwarz gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertung generiert.

### 6.15.5 Exemplarische Darstellung der radialen Verformungsgeschwindigkeit von gesunden und post-I/R-Herzen



**Abb. 6.18 Radiale Verformungsgeschwindigkeit des Endokards unter (patho-)physiologischen Bedingungen**

Repräsentative Kurvenverläufe der radialen Verformungsgeschwindigkeit [in cm/s] von CM Slack CTR- und CM Slack KO-Herzen unter Basalbedingungen (**A, B**) und nach I/R<sub>4Wochen</sub> (**C, D**) innerhalb von 3 Herzzyklen. Die Dynamik der einzelnen Wandregionen (6 Segmente aus 48 Punkten) ist farblich dargestellt: Anterior Apex (AA, pink), Anterior Basis (AB, dunkelblau), Anterior Mitte (AM, gelb), Posterior Apex (PA, hellblau), Posterior Basis (PB, grün), Posterior Mitte (PM, grau). Die mittlere Wandbewegung unter Berücksichtigung aller Einzelverläufe wird in schwarz gezeigt. Daten wurden aus B-Mode-Aufnahmen in PSLAX und ST-basierter echokardiographischer Auswertung generiert.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdallah, Y., Kasseckert, S. A., Iraqi, W., Said, M., Shahzad, T., Erdogan, A., Neuhof, C., Gunduz, D., Schluter, K. D., Tillmanns, H., Piper, H. M., Reusch, H. P., & Ladilov, Y. (2011). Interplay between Ca<sup>2+</sup> cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med*, *15*(11), 2478-2485.
- Abdul Kadir, L., Stacey, M., & Barrett-Jolley, R. (2018). Emerging Roles of the Membrane Potential: Action Beyond the Action Potential. *Front Physiol*, *9*, 1661.
- Ackerman, M. J., & Clapham, D. E. (1997). Ion channels--basic science and clinical disease. *N Engl J Med*, *336*(22), 1575-1586.
- Adler, J., Kuret, A., Langst, N., & Lukowski, R. (2020). Targets of cGMP/cGKI in Cardiac Myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, *75*(6), 494-507.
- Agah, R., Frenkel, P. A., French, B. A., Michael, L. H., Overbeek, P. A., & Schneider, M. D. (1997). Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest*, *100*(1), 169-179.
- Akao, M., Otani, H., Horie, M., Takano, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Kouchi, I., Murakami, T., & Sasayama, S. (1997). Myocardial ischemia induces differential regulation of KATP channel gene expression in rat hearts. *J Clin Invest*, *100*(12), 3053-3059.
- Albensi, B. C., Igoechi, C., Janigro, D., & Ilkanich, E. (2004). Why do many NMDA antagonists fail, while others are safe and effective at blocking excitotoxicity associated with dementia and acute injury? *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, *19*(5), 269-274.
- Alberts, B. J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Ali, S. R., Malone, T. J., Zhang, Y., Prechova, M., & Kaczmarek, L. K. (2020). Phactr1 regulates Slack (KCNT1) channels via protein phosphatase 1 (PP1). *FASEB J*, *34*(1), 1591-1601.
- Andrews, P., Thyssen, J., & Lorke, D. (1982). The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacol Ther*, *19*(2), 245-295.
- Armstrong, C. M. (2003). The Na/K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(10), 6257-6262.
- Ashraf, K. U., Josts, I., Mosbahi, K., Kelly, S. M., Byron, O., Smith, B. O., & Walker, D. (2016). The Potassium Binding Protein Kbp Is a Cytoplasmic Potassium Sensor. *Structure*, *24*(5), 741-749.
- Avkiran, M., & Marber, M. S. (2002). Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*, *39*(5), 747-753.
- Bader, C. R., Bernheim, L., & Bertrand, D. (1985). Sodium-activated potassium current in cultured avian neurones. *Nature*, *317*(6037), 540-542.
- Baines, C. P., Liu, G. S., Birincioglu, M., Critz, S. D., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (1999). Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol*, *276*(4), H1361-1368.
- Bajaj, A., Sethi, A., Rathor, P., Suppogu, N., & Sethi, A. (2015). Acute Complications of Myocardial Infarction in the Current Era: Diagnosis and Management. *J Invest Med*, *63*(7), 844-855.
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J. L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L., & Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*, *44*(11), 1255-1259.
- Baronas, V. A., & Kurata, H. T. (2014). Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol*, *5*, 325.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284.
- Bauer, M., Cheng, S., Jain, M., Ngoy, S., Theodoropoulos, C., Trujillo, A., Lin, F. C., & Liao, R. (2011). Echocardiographic speckle-tracking based strain imaging for rapid cardiovascular phenotyping in mice. *Circ Res*, *108*(8), 908-916.
- Bausch, A. E., Dieter, R., Nann, Y., Hausmann, M., Meyerdierks, N., Kaczmarek, L. K., Ruth, P., & Lukowski, R. (2015). The sodium-activated potassium channel Slack is required for optimal cognitive flexibility in mice. *Learn Mem*, *22*(7), 323-335.
- Bausch, A. E., Ehinger, R., Straubinger, J., Zerfass, P., Nann, Y., & Lukowski, R. (2018). Loss of Sodium-Activated Potassium Channel Slack and FMRP Differentially Affect Social Behavior in Mice. *Neuroscience*, *384*, 361-374.
- Bayat, H., Swaney, J. S., Ander, A. N., Dalton, N., Kennedy, B. P., Hammond, H. K., & Roth, D. M. (2002). Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Research in Cardiology*, *97*(3), 206-213.
- Bell, R. M., & Yellon, D. M. (2003). Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*, *35*(2), 185-193.
- Beyhoff, N., Brix, S., Betz, I. R., Klopffleisch, R., Foryst-Ludwig, A., Krannich, A., Stawowy, P., Knebel, F., Grune, J., & Kintscher, U. (2017). Application of Speckle-Tracking Echocardiography in an Experimental Model of Isolated Subendocardial Damage. *J Am Soc Echocardiogr*, *30*(12), 1239-1250 e1232.

- Bhan, A., Sirker, A., Zhang, J., Protti, A., Catibog, N., Driver, W., Botnar, R., Monaghan, M. J., & Shah, A. M. (2014). High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(9), H1371-1383.
- Bhattacharjee, A., Gan, L., & Kaczmarek, L. K. (2002). Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 454(3), 241-254.
- Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., & Kaczmarek, L. K. (2003). Slick (Slc2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J Neurosci*, 23(37), 11681-11691.
- Bhattacharjee, A., & Kaczmarek, L. K. (2005). For K<sup>+</sup> channels, Na<sup>+</sup> is the new Ca<sup>2+</sup>. *Trends Neurosci*, 28(8), 422-428.
- Bhattacharjee, A., von Hehn, C. A., Mei, X., & Kaczmarek, L. K. (2005). Localization of the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel Slick in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 484(1), 80-92.
- Bijnens, B., Claus, P., Weidemann, F., Strotmann, J., & Sutherland, G. R. (2007). Investigating cardiac function using motion and deformation analysis in the setting of coronary artery disease. *Circulation*, 116(21), 2453-2464.
- Bischof, H., Burgstaller, S., Springer, A., Matt, L., Rauter, T., Bachkonig, O. A., Schmidt, T., Groschner, K., Schindl, R., Madl, T., Plesnila, N., Lukowski, R., Graier, W. F., & Malli, R. (2021). Potassium ions promote hexokinase-II dependent glycolysis. *iScience*, 24(4), 102346.
- Bischof, H., Rehberg, M., Stryeck, S., Artinger, K., Eroglu, E., Waldeck-Weiermair, M., Gottschalk, B., Rost, R., Deak, A. T., Niedrist, T., Vujic, N., Lindermuth, H., Prassl, R., Pelzmann, B., Groschner, K., Kratky, D., Eller, K., Rosenkranz, A. R., Madl, T., Plesnila, N., Graier, W. F., & Malli, R. (2017). Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo. *Nat Commun*, 8(1), 1422.
- Biton, B., Sethuramanujam, S., Picchione, K. E., Bhattacharjee, A., Khessibi, N., Chesney, F., Lanneau, C., Curet, O., & Avenet, P. (2012). The antipsychotic drug loxapine is an opener of the sodium-activated potassium channel slack (Slc2.2). *J Pharmacol Exp Ther*, 340(3), 706-715.
- Bohl, S., Medway, D. J., Schulz-Menger, J., Schneider, J. E., Neubauer, S., & Lygate, C. A. (2009). Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(6), H2054-2058.
- Bork, N. I., Kuret, A., Cruz Santos, M., Molina, C. E., Reiter, B., Reichenspurner, H., Friebe, A., Skryabin, B. V., Rozhdestvensky, T. S., Kuhn, M., Lukowski, R., & Nikolaev, V. O. (2021). Rise of cGMP by partial phosphodiesterase-3A degradation enhances cardioprotection during hypoxia. *Redox Biol*, 48, 102179.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brauner, T., Hulser, D. F., & Strasser, R. J. (1984). Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim Biophys Acta*, 771(2), 208-216.
- Brini, M., & Carafoli, E. (2011). The plasma membrane Ca(2)<sup>+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(2).
- Brock, T. A., & Smith, J. B. (1982). Reversible stimulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump by monensin in cultures of vascular smooth muscle. *Life Sci*, 31(10), 1043-1050.
- Brockway, B. P., Mills, P. A., & Azar, S. H. (1991). A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clin Exp Hypertens A*, 13(5), 885-895.
- Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V. R., Chen, Y., Strumbos, J. G., Sigworth, F. J., Navaratnam, D., & Kaczmarek, L. K. (2010). Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. *Nat Neurosci*, 13(7), 819-821.
- Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V. R., Spilianakis, C. G., Flavell, R. A., von Hehn, C. A., Bhattacharjee, A., & Kaczmarek, L. K. (2008). Amino-terminal isoforms of the Slack K<sup>+</sup> channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. *J Physiol*, 586(21), 5161-5179.
- Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M. H., Sun, L., & Mochly-Rosen, D. (2010). Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 88(1), 83-92.
- Burley, D. S., Ferdinandy, P., & Baxter, G. F. (2007). Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol*, 152(6), 855-869.
- Cahill, T. J., & Kharbanda, R. K. (2017). Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol*, 9(5), 407-415.
- Cao, Z., Liu, L., & Van Winkle, D. M. (2005). Met5-enkephalin-induced cardioprotection occurs via transactivation of EGFR and activation of PI3K. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(4), H1955-1964.
- Caricati-Neto, A., Errante, P. R., & Menezes-Rodrigues, F. S. (2019). Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *Int J Mol Sci*, 20(16).
- Carmeliet, E. (1978). Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circ Res*, 42(5), 577-587.
- Chan, F. K., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*, 979, 65-70.
- Chen, H., Kronengold, J., Yan, Y., Gazula, V. R., Brown, M. R., Ma, L., Ferreira, G., Yang, Y., Bhattacharjee, A., Sigworth, F. J., Salkoff, L., & Kaczmarek, L. K. (2009). The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels. *J Neurosci*, 29(17), 5654-5665.

- Chen, S., & Li, S. (2012). The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit*, 18(11), RA161-165.
- Chen, S., Lotz, C., Roewer, N., & Broscheit, J. A. (2018a). Comparison of volatile anesthetic-induced preconditioning in cardiac and cerebral system: molecular mechanisms and clinical aspects. *Eur J Med Res*, 23(1), 10.
- Chen, W., Mook, R. A., Jr., Premont, R. T., & Wang, J. (2018b). Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal*, 41, 89-96.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. J., Smith, A. C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C. H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., Brookes, P. S., Davidson, S. M., Duchon, M. R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M. J., Robinson, A. J., Work, L. M., Frezza, C., Krieg, T., & Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431-435.
- Chowdhury, S. A. K., Warren, C. M., Simon, J. N., Ryba, D. M., Batra, A., Varga, P., Kranias, E. G., Tardiff, J. C., Solaro, R. J., & Wolska, B. M. (2020). Modifications of Sarcoplasmic Reticulum Function Prevent Progression of Sarcomere-Linked Hypertrophic Cardiomyopathy Despite a Persistent Increase in Myofilament Calcium Response. *Front Physiol*, 11, 107.
- Chrysafieldes, S. M., Bordes, S., & Sharma, S. (2021). Physiology, Resting Potential *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Clay, J. R. (2009). Determining k channel activation curves from k channel currents often requires the goldman-hodgkin-katz equation. *Front Cell Neurosci*, 3, 20.
- Clegg, R. M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 6(1), 103-110.
- Cohen, M. V., Yang, X. M., & Downey, J. M. (2007). The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, 115(14), 1895-1903.
- Cole, B. A., Johnson, R. M., Dejakaisaya, H., Pilati, N., Fishwick, C. W. G., Muench, S. P., & Lippiat, J. D. (2020). Structure-Based Identification and Characterization of Inhibitors of the Epilepsy-Associated KNa1.1 (KCNT1) Potassium Channel. *iScience*, 23(5), 101100.
- Constantinides, C., Mean, R., & Janssen, B. J. (2011). Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse. *ILAR J*, 52(3), e21-31.
- Coppini, R., Ferrantini, C., Mazzoni, L., Sartiani, L., Olivotto, I., Poggesi, C., Cerbai, E., & Mugelli, A. (2013). Regulation of intracellular Na<sup>+</sup> in health and disease: pathophysiological mechanisms and implications for treatment. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013(3), 222-242.
- Cosby, R. S., Giddings, J. A., See, J. R., & Mayo, M. (1976). Late complications of myocardial infarction. *JAMA*, 236(15), 1717-1720.
- Costa, A. D., & Garlid, K. D. (2008). Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(2), H874-882.
- Costa, A. D., Garlid, K. D., West, I. C., Lincoln, T. M., Downey, J. M., Cohen, M. V., & Critz, S. D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res*, 97(4), 329-336.
- Costa, A. D., Pierre, S. V., Cohen, M. V., Downey, J. M., & Garlid, K. D. (2008). cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res*, 77(2), 344-352.
- Costa, A. D., Quinlan, C. L., Andrukhiv, A., West, I. C., Jaburek, M., & Garlid, K. D. (2006). The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(1), H406-415.
- Cross, H. R., Lu, L., Steenbergen, C., Philipson, K. D., & Murphy, E. (1998). Overexpression of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in male, but not female, transgenic mice. *Circ Res*, 83(12), 1215-1223.
- Cross, H. R., Radda, G. K., & Clarke, K. (1995). The role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a 31P, 23Na and 87Rb NMR spectroscopic study. *Magn Reson Med*, 34(5), 673-685.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6), 582-592.
- Das, A., Smolenski, A., Lohmann, S. M., & Kukreja, R. C. (2006). Cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *J Biol Chem*, 281(50), 38644-38652.
- De Celle, T., Heeringa, P., Strzelecka, A. E., Bast, A., Smits, J. F., & Janssen, B. J. (2004). Sustained protective effects of 7-monohydroxyethylrutoside in an in vivo model of cardiac ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 494(2-3), 205-212.
- de Los Angeles Tejada, M., Stolpe, K., Meinild, A. K., & Klaerke, D. A. (2012). Clofilium inhibits Slick and Slack potassium channels. *Biologics*, 6, 465-470.
- De Villiers, C., & Riley, P. R. (2020). Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech*, 13(11).
- del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J. L., Tsuji, T., Doye, A. A., Gwathmey, J. K., & Hajjar, R. J. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5622-5627.
- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., & Kitsis, R. N. (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev*, 99(4), 1765-1817.

- Dewald, O., Ren, G., Duerr, G. D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., Tincey, S., Michael, L. H., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2004). Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, *164*(2), 665-677.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601-605.
- Dixon, D. L., & Abbate, A. (2015). Potassium levels in acute myocardial infarction: definitely worth paying attention to. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, *1*(4), 252-253.
- Downey, J. M., & Cohen, M. V. (2000). Do mitochondrial K(ATP) channels serve as triggers rather than end-effectors of ischemic preconditioning's protection? *Basic Res Cardiol*, *95*(4), 272-274.
- Downey, J. M., Davis, A. M., & Cohen, M. V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*, *12*(3-4), 181-188.
- Downey, J. M., Krieg, T., & Cohen, M. V. (2008). Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann N Y Acad Sci*, *1123*, 187-196.
- Dryer, S. E. (1994). Na(+)-activated K+ channels: a new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci*, *17*(4), 155-160.
- Dryer, S. E., Fujii, J. T., & Martin, A. R. (1989). A Na+-activated K+ current in cultured brain stem neurones from chicks. *J Physiol*, *410*, 283-296.
- Dun, W., Baba, S., Yagi, T., & Boyden, P. A. (2004). Dynamic remodeling of K+ and Ca2+ currents in cells that survived in the epicardial border zone of canine healed infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *287*(3), H1046-1054.
- Dursun, I., & Sahin, M. (2006). Difficulties in maintaining potassium homeostasis in patients with heart failure. *Clin Cardiol*, *29*(9), 388-392.
- Eckle, T., Grenz, A., Kohler, D., Redel, A., Falk, M., Rolauffs, B., Osswald, H., Kehl, F., & Eltzschig, H. K. (2006). Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *291*(5), H2533-2540.
- Ehinger, R., Kuret, A., Matt, L., Frank, N., Wild, K., Kabagema-Bilan, C., Bischof, H., Malli, R., Ruth, P., Bausch, A. E., & Lukowski, R. (2021). Slack K(+) channels attenuate NMDA-induced excitotoxic brain damage and neuronal cell death. *FASEB J*, *35*(5), e21568.
- Emde, B., Heinen, A., Godecke, A., & Bottermann, K. (2014). Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *Eur J Histochem*, *58*(4), 2448.
- Engstrom, T., Kelbaek, H., Helqvist, S., Hofsten, D. E., Klovgaard, L., Clemmensen, P., Holmvang, L., Jorgensen, E., Pedersen, F., Saunamaki, K., Ravkilde, J., Tilsted, H. H., Villadsen, A., Aaroe, J., Jensen, S. E., Raungaard, B., Botker, H. E., Terkelsen, C. J., Maeng, M., Kaltoft, A., Krusell, L. R., Jensen, L. O., Veien, K. T., Kofoed, K. F., Torp-Pedersen, C., Kyhl, K., Nepper-Christensen, L., Treiman, M., Vejlstrup, N., Ahtarovski, K., Lonborg, J., Kober, L., & Third Danish Study of Optimal Acute Treatment of Patients With, S. T. E. M. I.-I. P. I. (2017). Effect of Ischemic Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*, *2*(5), 490-497.
- Enzie, F. D., & Colglazier, M. L. (1960). Preliminary trials with bithionol against tapeworm infections in cats, dogs, sheep, and chickens. *Am J Vet Res*, *21*, 628-630.
- Felgner, P. L., & Ringold, G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, *337*(6205), 387-388.
- Feng, J., Lucchinetti, E., Ahuja, P., Pasch, T., Perriard, J. C., & Zaugg, M. (2005). Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology*, *103*(5), 987-995.
- Ferdinandy, P., Schulz, R., & Baxter, G. F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*, *59*(4), 418-458.
- Ferreira, J. J., Butler, A., Stewart, R., Gonzalez-Cota, A. L., Lybaert, P., Amazu, C., Reinl, E. L., Wackle-Prabakaran, M., Salkoff, L., England, S. K., & Santi, C. M. (2018). Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na(+/-) activated K(+/-) channel, Slo2.1. *J Physiol*.
- Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J., Jr. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, *46*(4), 470-472.
- Fitz, J. G., Trouillot, T. E., & Scharshmidt, B. F. (1989). Effect of pH on membrane potential and K+ conductance in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol*, *257*(6 Pt 1), G961-968.
- Flauaus, C., Engel, P., Zhou, F., Petersen, J., Ruth, P., Lukowski, R., Schmidtko, A., & Lu, R. (2022). Slick Potassium Channels Control Pain and Itch in Distinct Populations of Sensory and Spinal Neurons in Mice. *Anesthesiology*, *136*(5), 802-822.
- Fleming, M. R., Brown, M. R., Kronengold, J., Zhang, Y., Jenkins, D. P., Barcia, G., Nabbout, R., Bausch, A. E., Ruth, P., Lukowski, R., Navaratnam, D. S., & Kaczmarek, L. K. (2016). Stimulation of Slack K(+) Channels Alters Mass at the Plasma Membrane by Triggering Dissociation of a Phosphatase-Regulatory Complex. *Cell Rep*, *16*(9), 2281-2288.
- Fleming, M. R., & Kaczmarek, L. K. (2009). Use of optical biosensors to detect modulation of Slack potassium channels by G protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res*, *29*(3-4), 173-181.
- Fliegner, D., Gerdes, C., Meding, J., & Stasch, J. P. (2016). Translational In Vivo Models for Cardiovascular Diseases. *Handb Exp Pharmacol*, *232*, 223-234.

- Folse, R., & Braunwald, E. (1962). Determination of fraction of left ventricular volume ejected per beat and of ventricular end-diastolic and residual volumes. Experimental and clinical observations with a precordial dilution technic. *Circulation*, *25*, 674-685.
- Fonseca, B. D., Diering, G. H., Bidinosti, M. A., Dalal, K., Alain, T., Balgi, A. D., Forestieri, R., Nodwell, M., Rajadurai, C. V., Gunaratnam, C., Tee, A. R., Duong, F., Andersen, R. J., Orłowski, J., Numata, M., Sonenberg, N., & Roberge, M. (2012). Structure-activity analysis of niclosamide reveals potential role for cytoplasmic pH in control of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. *J Biol Chem*, *287*(21), 17530-17545.
- Forster, K., Kuno, A., Solenkova, N., Felix, S. B., & Krieg, T. (2007). The delta-opioid receptor agonist DADLE at reperfusion protects the heart through activation of pro-survival kinases via EGF receptor transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *293*(3), H1604-1608.
- Fozzard, H. A., & Sheu, S. S. (1982). The resting potential in heart muscle. *Adv Myocardiol*, *3*, 125-133.
- Frangogiannis, N. G. (2006). Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr Med Chem*, *13*(16), 1877-1893.
- Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*, *11*(5), 255-265.
- Frangogiannis, N. G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*, *5*(4), 1841-1875.
- Frankenreiter, S., Bednarczyk, P., Kniess, A., Bork, N., Straubinger, J., Koprowski, P., Wrzosek, A., Mohr, E., Logan, A., Murphy, M. P., Gawaz, M., Krieg, T., Szewczyk, A., Nikolaev, V. O., Ruth, P., & Lukowski, R. (2017). cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. *Circulation*.
- Frankenreiter, S., Groneberg, D., Kuret, A., Krieg, T., Ruth, P., Friebe, A., & Lukowski, R. (2018). Cardioprotection by ischemic postconditioning and cyclic guanosine monophosphate-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Cardiovasc Res*, *114*(6), 822-829.
- Freixa, X., Bellera, N., Ortiz-Perez, J. T., Jimenez, M., Pare, C., Bosch, X., De Caralt, T. M., Betriu, A., & Masotti, M. (2012). Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, *33*(1), 103-112.
- Fryer, R. M., Eells, J. T., Hsu, A. K., Henry, M. M., & Gross, G. J. (2000). Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *278*(1), H305-312.
- Fryer, R. M., Pratt, P. F., Hsu, A. K., & Gross, G. J. (2001). Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther*, *296*(2), 642-649.
- Fu, Y., Hu, N., Cao, M., Li, W. F., Yang, X. R., Gao, J. L., Zhao, J., Jiang, M., Ma, M. H., Sun, Z. J., & Dong, D. L. (2021). Anthelmintic niclosamide attenuates pressure-overload induced heart failure in mice. *Eur J Pharmacol*, *912*, 174614.
- Fujita, M., Asanuma, H., Hirata, A., Wakeno, M., Takahama, H., Sasaki, H., Kim, J., Takashima, S., Tsukamoto, O., Minamino, T., Shinozaki, Y., Tomoike, H., Hori, M., & Kitakaze, M. (2007). Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *292*(4), H2004-2008.
- Fuller, W., Parmar, V., Eaton, P., Bell, J. R., & Shattock, M. J. (2003). Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. *Cardiovasc Res*, *57*(4), 1044-1051.
- Gao, E., Lei, Y. H., Shang, X., Huang, Z. M., Zuo, L., Boucher, M., Fan, Q., Chuprun, J. K., Ma, X. L., & Koch, W. J. (2010). A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res*, *107*(12), 1445-1453.
- Gao, J. L., Zhao, J., Zhu, H. B., Peng, X., Zhu, J. X., Ma, M. H., Fu, Y., Hu, N., Tai, Y., Xuan, X. C., & Dong, D. L. (2018). Characterizations of mitochondrial uncoupling induced by chemical mitochondrial uncouplers in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*, *124*, 288-298.
- Gao, S., Ho, D., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2011). Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, *1*, 71-83.
- Gao, X. M., Dart, A. M., Dewar, E., Jennings, G., & Du, X. J. (2000). Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*, *45*(2), 330-338.
- Garcia-Dorado, D., Andres-Villarreal, M., Ruiz-Meana, M., Inverte, J., & Barba, I. (2012). Myocardial edema: a translational view. *J Mol Cell Cardiol*, *52*(5), 931-939.
- Garcia-Dorado, D., & Oliveras, J. (1993). Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res*, *27*(9), 1555-1563.
- Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., & Piper, H. M. (2009). Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovasc Res*, *83*(2), 165-168.
- Gargiulo, S., Gramanzini, M., & Mancini, M. (2016). Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Animal Models. *Int J Mol Sci*, *17*(9).
- Gargiulo, S., Greco, A., Gramanzini, M., Esposito, S., Affuso, A., Brunetti, A., & Vesce, G. (2012). Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J*, *53*(1), E55-69.
- Garlid, K. D., Dos Santos, P., Xie, Z. J., Costa, A. D., & Paucek, P. (2003). Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta*, *1606*(1-3), 1-21.

- Garlid, K. D., & Paucek, P. (2003). Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta*, 1606(1-3), 23-41.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D'Alonzo, A. J., Lodge, N. J., Smith, M. A., & Grover, G. J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 81(6), 1072-1082.
- Ge, Z. D., Pravdic, D., Bienengraeber, M., Pratt, P. F., Jr., Auchampach, J. A., Gross, G. J., Kersten, J. R., & Warltier, D. C. (2010). Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology*, 112(1), 73-85.
- Gillessen, T., Budd, S. L., & Lipton, S. A. (2002). Excitatory amino acid neurotoxicity. *Adv Exp Med Biol*, 513, 3-40.
- Gilman, A. G., Simon, M. I., Bourne, H. R., Harris, B. A., Long, R., Ross, E. M., Stull, J. T., Taussig, R., Bourne, H. R., Arkin, A. P., Cobb, M. H., Cyster, J. G., Devreotes, P. N., Ferrell, J. E., Fruman, D., Gold, M., Weiss, A., Stull, J. T., Berridge, M. J., Cantley, L. C., Catterall, W. A., Coughlin, S. R., Olson, E. N., Smith, T. F., Brugge, J. S., Botstein, D., Dixon, J. E., Hunter, T., Lefkowitz, R. J., Pawson, A. J., Sternberg, P. W., Varmus, H., Subramaniam, S., Sinkovits, R. S., Li, J., Mock, D., Ning, Y., Saunders, B., Sternweis, P. C., Hilgemann, D., Scheuermann, R. H., DeCamp, D., Hsueh, R., Lin, K. M., Ni, Y., Seaman, W. E., Simpson, P. C., O'Connell, T. D., Roach, T., Simon, M. I., Choi, S., Eversole-Cire, P., Fraser, I., Mumby, M. C., Zhao, Y., Brekken, D., Shu, H., Meyer, T., Chand, G., Heo, W. D., Liou, J., O'Rourke, N., Verghese, M., Mumby, S. M., Han, H., Brown, H. A., Forrester, J. S., Ivanova, P., Milne, S. B., Casey, P. J., Harden, T. K., Arkin, A. P., Doyle, J., Gray, M. L., Meyer, T., Michnick, S., Schmidt, M. A., Toner, M., Tsien, R. Y., Natarajan, M., Ranganathan, R., Sambrano, G. R., Participating, i., & scientists of the Alliance for Cellular, S. (2002). Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature*, 420(6916), 703-706.
- Goldman, D. E. (1943). Potential, Impedance, and Rectification in Membranes. *J Gen Physiol*, 27(1), 37-60.
- Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzun, I., Rojas, P., Naranjo, D., & Latorre, R. (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol*, 2(3), 2087-2149.
- Goswami, S. K., Ponnalagu, D., Hussain, A. T., Shah, K., Karekar, P., Gururaja Rao, S., Meredith, A. L., Khan, M., & Singh, H. (2018). Expression and Activation of BKCa Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function. *Front Cardiovasc Med*, 5, 194.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), 59-74.
- Grandi, E., Sanguinetti, M. C., Bartos, D. C., Bers, D. M., Chen-Izu, Y., Chiamvimonvat, N., Colecraft, H. M., Delisle, B. P., Heijman, J., Navedo, M. F., Noskov, S., Proenza, C., Vandenberg, J. I., & Yarov-Yarovoy, V. (2017). Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol*, 595(7), 2209-2228.
- Grant, A. O. (2009). Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2(2), 185-194.
- Gross, G. J. (2000). The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, 95(4), 280-284.
- Gross, G. J., Warltier, D. C., & Hardman, H. F. (1987). Comparative effects of nicorandil, a nicotinamide nitrate derivative, and nifedipine on myocardial reperfusion injury in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 10(5), 535-542.
- Grover, G. J., McCullough, J. R., Henry, D. E., Conder, M. L., & Sleph, P. G. (1989). Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther*, 251(1), 98-104.
- Guo, Y., Wu, W. J., Qiu, Y., Tang, X. L., Yang, Z., & Bolli, R. (1998). Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*, 275(4), H1375-1387.
- Hahn, J. Y., Song, Y. B., Kim, E. K., Yu, C. W., Bae, J. W., Chung, W. Y., Choi, S. H., Choi, J. H., Bae, J. H., An, K. J., Park, J. S., Oh, J. H., Kim, S. W., Hwang, J. Y., Ryu, J. K., Park, H. S., Lim, D. S., & Gwon, H. C. (2013). Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation*, 128(17), 1889-1896.
- Haimann, C., Bernheim, L., Bertrand, D., & Bader, C. R. (1990). Potassium current activated by intracellular sodium in quail trigeminal ganglion neurons. *J Gen Physiol*, 95(5), 961-979.
- Haimann, C., Magistretti, J., & Pozzi, B. (1992). Sodium-activated potassium current in sensory neurons: a comparison of cell-attached and cell-free single-channel activities. *Pflugers Arch*, 422(3), 287-294.
- Hamm, C. M., Möllmann, H., Bassand, J. P., & al., e. (2009). Acute coronary syndromes. In: A.J. Camm, T.F. Lüscher, P.W. Serruys (Eds.): The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine; 2nd edition. *Oxford University Press 2009*.
- Hausenloy, D. J., Tsang, A., & Yellon, D. M. (2005). The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med*, 15(2), 69-75.
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2008). Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*, 79(3), 377-386.
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, 123(1), 92-100.
- Hayashi, M., Wang, J., Hede, S. E., & Novak, I. (2012). An intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is important for secretion in pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(2), C151-159.

- Hearse, D. J., & Tosaki, A. (1987). Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ Res*, *60*(3), 375-383.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J*, *66*(4), 1061-1067.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, *6*(10), 986-994.
- Heimdahl, A., Stoylen, A., Torp, H., & Skjaerpe, T. (1998). Real-time strain rate imaging of the left ventricle by ultrasound. *J Am Soc Echocardiogr*, *11*(11), 1013-1019.
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(8), 589-600.
- Heinen, A., Nederlof, R., Panjwani, P., Spsychala, A., Tschaidse, T., Reffelt, H., Boy, J., Raupach, A., Godecke, S., Petzsch, P., Kohrer, K., Grandoch, M., Petz, A., Fischer, J. W., Alter, C., Vasilevska, J., Lang, P., & Godecke, A. (2019). IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*, *27*(1), 46-58.
- Heusch, G. (2013). Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*, *381*(9861), 166-175.
- Heusch, G. (2015). Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*, *116*(4), 674-699.
- Heusch, G. (2020). Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol*, *17*(12), 773-789.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, *90*(1), 291-366.
- Hjalmarsdóttir, B. (2005). *Hämodynamische Untersuchung zur vollständig antagonisierbaren Anästhesie mit Medetomidin, Modazolam und Fentanyl im Vergleich zur Ketamin/Xylazin Kombinationsanästhesie bei der Maus*. (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München, München. (4735)
- Hodgkin, A. L., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, *108*(1), 37-77.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., & Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, *86*(1), 1-23.
- Hoit, B. D. (2006). Echocardiographic characterization of the cardiovascular phenotype in rodent models. *Toxicol Pathol*, *34*(1), 105-110.
- Hoppe, U. C. (2009). Characteristics of If channel inhibition. *Der Kardiologe, Springer Medizin Verlag*, 3:4-7.
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *N Engl J Med*, *361*(16), 1570-1583.
- Houser, S. R., Margulies, K. B., Murphy, A. M., Spinale, F. G., Francis, G. S., Prabhu, S. D., Rockman, H. A., Kass, D. A., Molkentin, J. D., Sussman, M. A., Koch, W. J., American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, C. o. C. C., Council on Functional, G., & Translational, B. (2012). Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res*, *111*(1), 131-150.
- Hua, F., Wu, Z., Yan, X., Zheng, J., Sun, H., Cao, X., & Bian, J. S. (2018). DR region of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase is a new target to protect heart against oxidative injury. *Sci Rep*, *8*(1), 13100.
- Huang, G., Hao, F., & Hu, X. (2019). Downregulation of microRNA-155 stimulates sevoflurane-mediated cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury by binding to SIRT1 in mice. *J Cell Biochem*, *120*(9), 15494-15505.
- Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2019). Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci*, *4*(3), 449-467.
- Iliodromitis, E. K., Kremastinos, D. T., Katriotis, D. G., Papadopoulos, C. C., & Hearse, D. J. (1997). Multiple cycles of preconditioning cause loss of protection in open-chest rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(3), 915-920.
- Iliodromitis, E. K., Lazou, A., & Kremastinos, D. T. (2007). Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag*, *3*(5), 629-637.
- Imahashi, K., Kusuoka, H., Hashimoto, K., Yoshioka, J., Yamaguchi, H., & Nishimura, T. (1999). Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res*, *84*(12), 1401-1406.
- Imahashi, K., Pott, C., Goldhaber, J. I., Steenbergen, C., Philipson, K. D., & Murphy, E. (2005). Cardiac-specific ablation of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, *97*(9), 916-921.
- Inagaki, K., Churchill, E., & Mochly-Rosen, D. (2006). Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res*, *70*(2), 222-230.
- Inserte, J., Barba, I., Poncelas-Nozal, M., Hernando, V., Agullo, L., Ruiz-Meana, M., & Garcia-Dorado, D. (2011). cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, *50*(5), 903-909.
- Isenberg, G., Vereecke, J., van der Heyden, G., & Carmeliet, E. (1983). The shortening of the action potential by DNP in guinea-pig ventricular myocytes is mediated by an increase of a time-independent K conductance. *Pflugers Arch*, *397*(4), 251-259.
- Ivashchenko, C. Y., Pipes, G. C., Lozinskaya, I. M., Lin, Z., Xiaoping, X., Needle, S., Grygielko, E. T., Hu, E., Toomey, J. R., Lepore, J. J., & Willette, R. N. (2013). Human-induced pluripotent stem cell-derived

- cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(6), H913-922.
- Iwai, T., Tanonaka, K., Inoue, R., Kasahara, S., Motegi, K., Nagaya, S., & Takeo, S. (2002). Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res*, 55(1), 141-149.
- Jamal, F., Strotmann, J., Weidemann, F., Kukulski, T., D'Hooge, J., Bijnens, B., Van de Werf, F., De Scheerder, I., & Sutherland, G. R. (2001). Noninvasive quantification of the contractile reserve of stunned myocardium by ultrasonic strain rate and strain. *Circulation*, 104(9), 1059-1065.
- James, P. F., Grupp, I. L., Grupp, G., Woo, A. L., Askew, G. R., Croyle, M. L., Walsh, R. A., & Lingrel, J. B. (1999). Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell*, 3(5), 555-563.
- Jeevaratnam, K., Chadda, K. R., Huang, C. L., & Camm, A. J. (2018). Cardiac Potassium Channels: Physiological Insights for Targeted Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 23(2), 119-129.
- Jenkins, D. P., Baxter, G. F., & Yellon, D. M. (1995). The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res*, 31(3-4), 219-224.
- Jennings, R. B., & Ganote, C. E. (1974). Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*, 35 Suppl 3, 156-172.
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., & Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70, 68-78.
- Jiang, M., Cabo, C., Yao, J., Boyden, P. A., & Tseng, G. (2000). Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res*, 48(1), 34-43.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2001). Structure of the RCK domain from the E. coli K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron*, 29(3), 593-601.
- Joiner, W. J., Tang, M. D., Wang, L. Y., Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Gan, L., Gribkoff, V. K., & Kaczmarek, L. K. (1998). Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nat Neurosci*, 1(6), 462-469.
- Jugdutt, B. I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, 108(11), 1395-1403.
- Jurkat-Rott, K., & Lehmann-Horn, F. (2004). The patch clamp technique in ion channel research. *Curr Pharm Biotechnol*, 5(4), 387-395.
- Kaczmarek, L. K. (2013). Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN Neurosci*, 2013(2013).
- Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., & Irisawa, H. (1984). Intracellular Na<sup>+</sup> activates a K<sup>+</sup> channel in mammalian cardiac cells. *Nature*, 309(5966), 354-356.
- Kang, P. M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A., & Izumo, S. (2000). Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res*, 87(2), 118-125.
- Karlsson, M., Zhang, C., Mear, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjostedt, E., Butler, L., Odeberg, J., Dusart, P., Edfors, F., Oksvold, P., von Feilitzen, K., Zwahlen, M., Arif, M., Altay, O., Li, X., Ozcan, M., Mardinoglu, A., Fagerberg, L., Mulder, J., Luo, Y., Ponten, F., Uhlen, M., & Lindskog, C. (2021). A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*, 7(31).
- Karmazyn, M. (1998). The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med*, 47(2), 65-72.
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1-5.
- Kawasaki, Y., Kuki, I., Ehara, E., Murakami, Y., Okazaki, S., Kawawaki, H., Hara, M., Watanabe, Y., Kishimoto, S., Suda, K., Saitsu, H., & Matsumoto, N. (2017). Three Cases of KCNT1 Mutations: Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy with Massive Systemic to Pulmonary Collateral Arteries. *J Pediatr*, 191, 270-274.
- Kehl, S. J. (1991). Quinidine-induced inhibition of the fast transient outward K<sup>+</sup> current in rat melanotrophs. *Br J Pharmacol*, 103(3), 1807-1813.
- Keller, J. N., Germeyer, A., Begley, J. G., & Mattson, M. P. (1997). 17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron. *J Neurosci Res*, 50(4), 522-530.
- Kersten, J. R., Schmeling, T. J., Pagel, P. S., Gross, G. J., & Warltier, D. C. (1997). Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*, 87(2), 361-370.
- Khalil, N. N., & McCain, M. L. (2021). Engineering the Cellular Microenvironment of Post-infarct Myocardium on a Chip. *Front Cardiovasc Med*, 8, 709871.
- Khan, M. A., Hashim, M. J., Mustafa, H., Baniyas, M. Y., Al Suwaidi, S., AlKatheeri, R., Alblooshi, F. M. K., Almatrooshi, M., Alzaabi, M. E. H., Al Darmaki, R. S., & Lootah, S. (2020). Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*, 12(7), e9349.
- Kim, G. E., & Kaczmarek, L. K. (2014). Emerging role of the KCNT1 Slack channel in intellectual disability. *Front Cell Neurosci*, 8, 209.
- Kim, J. K., Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2006). Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J Biol Chem*, 281(10), 6760-6767.
- Kim, U., & McCormick, D. A. (1998). Functional and ionic properties of a slow afterhyperpolarization in ferret perigeniculate neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 80(3), 1222-1235.

- Kin, H., Zhao, Z. Q., Sun, H. Y., Wang, N. P., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2004). Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, *62*(1), 74-85.
- Kjeldsen, K. (2003). Myocardial Na,K-ATPase: Clinical aspects. *Exp Clin Cardiol*, *8*(3), 131-133.
- Kjeldsen, K. P., & Schmidt, T. A. (2019). Potassium homeostasis and pathophysiology of hyperkalaemia. *Eur Heart J Suppl*, *21*(Suppl A), A2-A5.
- Kloner, R. A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L., & Braunwald, E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, *97*(18), 1848-1867.
- Klosinska, D., Ciszek, B., Majchrzak, B., Badurek, I., & Ratajska, A. (2020). Diversity of coronary arterial tree in laboratory mice. *Folia Morphol (Warsz)*, *79*(2), 255-264.
- Kober, F., Iltis, I., Cozzone, P. J., & Bernard, M. (2004). Cine-MRI assessment of cardiac function in mice anesthetized with ketamine/xylazine and isoflurane. *MAGMA*, *17*(3-6), 157-161.
- Kohli, U., Ravishankar, C., & Nordli, D. (2020). Cardiac phenotypic spectrum of KCNT1 mutations. *Cardiol Young*, 1-5.
- Korge, P., Honda, H. M., & Weiss, J. N. (2002). Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(5), 3312-3317.
- Korichneva, I., Hoyos, B., Chua, R., Levi, E., & Hammerling, U. (2002). Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem*, *277*(46), 44327-44331.
- Krenning, B. J., Voormolen, M. M., & Roelandt, J. R. (2003). Assessment of left ventricular function by three-dimensional echocardiography. *Cardiovasc Ultrasound*, *1*, 12.
- Krogager, M. L., Eggers-Kaas, L., Aasbjerg, K., Mortensen, R. N., Kober, L., Gislason, G., Torp-Pedersen, C., & Sogaard, P. (2015). Short-term mortality risk of serum potassium levels in acute heart failure following myocardial infarction. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, *1*(4), 245-251.
- Kuchenbuch, M., Barcia, G., Chemaly, N., Carme, E., Roubertie, A., Gibaud, M., Van Bogaert, P., de Saint Martin, A., Hirsch, E., Dubois, F., Sarret, C., Nguyen The Tich, S., Laroche, C., des Portes, V., Billette de Villemeur, T., Barthez, M. A., Auvin, S., Bahi-Buisson, N., Desguerre, I., Kaminska, A., Benquet, P., & Nabbout, R. (2019). KCNT1 epilepsy with migrating focal seizures shows a temporal sequence with poor outcome, high mortality and SUDEP. *Brain*, *142*(10), 2996-3008.
- Kumstel, S., Vasudevan, P., Palme, R., Zhang, X., Wendt, E. H. U., David, R., Vollmar, B., & Zechner, D. (2020). Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer. *J Adv Res*, *21*, 35-47.
- Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Margreiter, R., Grimm, M., Hagenbuchner, J., & Ausserlechner, M. J. (2019). The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel)*, *8*(10).
- Kwok, W. M., & Aizawa, K. (2004). Preconditioning of the myocardium by volatile anesthetics. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, *2*(3), 249-255.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lange, M., Redel, A., Lotz, C., Smul, T. M., Blomeyer, C., Frank, A., Stumpner, J., Roewer, N., & Kehl, F. (2009). Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signaling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Anesthesiology*, *110*(3), 516-528.
- Lascano, E. C., Negroni, J. A., & del Valle, H. F. (2002). Ischemic shortening of action potential duration as a result of KATP channel opening attenuates myocardial stunning by reducing calcium influx. *Mol Cell Biochem*, *236*(1-2), 53-61.
- Laskey, W. K., Yoon, S., Calzada, N., & Ricciardi, M. J. (2008). Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Catheter Cardiovasc Interv*, *72*(2), 212-220.
- Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., & Changotade, S. (2014). Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem*, *62*(10), 751-758.
- Lee, A., Fakler, B., Kaczmarek, L. K., & Isom, L. L. (2014). More than a pore: ion channel signaling complexes. *J Neurosci*, *34*(46), 15159-15169.
- Lemasters, J. J., Bond, J. M., Chacon, E., Harper, I. S., Kaplan, S. H., Ohata, H., Trollinger, D. R., Herman, B., & Cascio, W. E. (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*, *76*, 99-114.
- Lemoine, S., Tritapepe, L., Hanouz, J. L., & Puddu, P. E. (2016). The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans? *Br J Anaesth*, *116*(4), 456-475.
- Levi, A. J., Lee, C. O., & Brooksby, P. (1994). Properties of the fluorescent sodium indicator "SBFI" in rat and rabbit cardiac myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*, *5*(3), 241-257.
- Li, S. L., Yan, J., Zhang, Y. Q., Zhen, C. L., Liu, M. Y., Jin, J., Gao, J. L., Xiao, X. L., Shen, X., Tai, Y., Hu, N., Zhang, X. Z., Sun, Z. J., & Dong, D. L. (2017). Niclosamide ethanolamine inhibits artery constriction. *Pharmacol Res*, *115*, 78-86.
- Lindsey, M. L., Iyer, R. P., Jung, M., DeLeon-Pennell, K. Y., & Ma, Y. (2016). Matrix metalloproteinases as input and output signals for post-myocardial infarction remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, *91*, 134-140.

- Liu, C., Bai, Y., Chen, Y., Wang, Y., Sottejeau, Y., Liu, L., Li, X., Lingrel, J. B., Malhotra, D., Cooper, C. J., Shapiro, J. I., Xie, Z. J., & Tian, J. (2012). Reduction of Na/K-ATPase potentiates marinobufagenin-induced cardiac dysfunction and myocyte apoptosis. *J Biol Chem*, *287*(20), 16390-16398.
- Liu, G. S., Thornton, J., Van Winkle, D. M., Stanley, A. W., Olsson, R. A., & Downey, J. M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, *84*(1), 350-356.
- Liu, H., Yanamandala, M., Lee, T. C., & Kim, J. K. (2014). Mitochondrial p38beta and manganese superoxide dismutase interaction mediated by estrogen in cardiomyocytes. *PLoS One*, *9*(1), e85272.
- Liu, R. M., & Desai, L. P. (2015). Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol*, *6*, 565-577.
- Liu, Y., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (1994a). Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*, *8*(6), 881-882.
- Liu, Y., & Downey, J. M. (1992). Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol*, *263*(4 Pt 2), H1107-1112.
- Liu, Y., Ytrehus, K., & Downey, J. M. (1994b). Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, *26*(5), 661-668.
- Lodrin, A. M., & Goumans, M. J. (2021). Cardiomyocytes Cellular Phenotypes After Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*, *8*, 750510.
- Lotz, C., & Kehl, F. (2015). Volatile anesthetic-induced cardiac protection: molecular mechanisms, clinical aspects, and interactions with nonvolatile agents. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, *29*(3), 749-760.
- Lu, R., Bausch, A. E., Kallenborn-Gerhardt, W., Stoetzer, C., Debruin, N., Ruth, P., Geisslinger, G., Leffler, A., Lukowski, R., & Schmidtko, A. (2015). Slack channels expressed in sensory neurons control neuropathic pain in mice. *J Neurosci*, *35*(3), 1125-1135.
- Lu, R., Metzner, K., Zhou, F., Flauaus, C., Balzulat, A., Engel, P., Petersen, J., Ehinger, R., Bausch, A., Ruth, P., Lukowski, R., & Schmidtko, A. (2021). Functional Coupling of Slack Channels and P2X3 Receptors Contributes to Neuropathic Pain Processing. *Int J Mol Sci*, *22*(1).
- Luedde, M., Lutz, M., Carter, N., Sosna, J., Jacoby, C., Vucur, M., Gautheron, J., Roderburg, C., Borg, N., Reisinger, F., Hippe, H. J., Linkermann, A., Wolf, M. J., Rose-John, S., Lullmann-Rauch, R., Adam, D., Fogel, U., Heikenwalder, M., Luedde, T., & Frey, N. (2014). RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, *103*(2), 206-216.
- Luk, H. N., & Carmeliet, E. (1990). Na(+)-activated K+ current in cardiac cells: rectification, open probability, block and role in digitalis toxicity. *Pflugers Arch*, *416*(6), 766-768.
- Lukowski, R., Cruz Santos, M., Kuret, A., & Ruth, P. (2021). cGMP and mitochondrial K(+) channels - Compartmentalized but closely connected in cardioprotection. *Br J Pharmacol*.
- Luo, T., Liu, H., & Kim, J. K. (2016). Estrogen Protects the Female Heart from Ischemia/Reperfusion Injury through Manganese Superoxide Dismutase Phosphorylation by Mitochondrial p38beta at Threonine 79 and Serine 106. *PLoS One*, *11*(12), e0167761.
- Lutgens, E., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., Debets, J., Leenders, P., & Smits, J. F. (1999). Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res*, *41*(3), 586-593.
- Maack, C., & O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol*, *102*(5), 369-392.
- Mani, S. K., Balasubramanian, S., Zavadzka, J. A., Jeffords, L. B., Rivers, W. T., Zile, M. R., Mukherjee, R., Spinale, F. G., & Kuppaswamy, D. (2009). Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *297*(5), H1744-1751.
- Mann, D. L. (2002). Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*, *91*(11), 988-998.
- Martinez-Espinosa, P. L., Wu, J., Yang, C., Gonzalez-Perez, V., Zhou, H., Liang, H., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2015). Knockout of Slo2.2 enhances itch, abolishes KNa current, and increases action potential firing frequency in DRG neurons. *Elife*, *4*.
- Mathie, A., Veale, E. L., & Holden, R. G. (2021). Heterologous Expression of Ion Channels in Mammalian Cell Lines. *Methods Mol Biol*, *2188*, 51-65.
- Matsa, E., Ahrens, J. H., & Wu, J. C. (2016). Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Platform for Personalized and Precision Cardiovascular Medicine. *Physiol Rev*, *96*(3), 1093-1126.
- Matt, L., Pham, T., Skrabak, D., Hoffmann, F., Eckert, P., Yin, J., Gisevius, M., Ehinger, R., Bausch, A., Ueffing, M., Boldt, K., Ruth, P., & Lukowski, R. (2021). The Na(+)-activated K(+) channel Slack contributes to synaptic development and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, *78*(23), 7569-7587.
- McCormack, K. J., & Chapleo, C. B. (1998). Opioid receptors and myocardial protection: do opioid agonists possess cardioprotective effects? *Clin Drug Investig*, *15*(5), 445-454.
- Methner, C., Lukowski, R., Grube, K., Loga, F., Smith, R. A., Murphy, M. P., Hofmann, F., & Krieg, T. (2013). Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res Cardiol*, *108*(2), 337.
- Methner, C., Schmidt, K., Cohen, M. V., Downey, J. M., & Krieg, T. (2010). Both A2a and A2b adenosine receptors at reperfusion are necessary to reduce infarct size in mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *299*(4), H1262-1264.
- Michael, L. H., Ballantyne, C. M., Zachariah, J. P., Gould, K. E., Pocius, J. S., Taffet, G. E., Hartley, C. J., Pham, T. T., Daniel, S. L., Funk, E., & Entman, M. L. (1999). Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol*, *277*(2 Pt 2), H660-668.

- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K., Berens, K., & Ballantyne, C. M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, *269*(6 Pt 2), H2147-2154.
- Minta, A., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem*, *264*(32), 19449-19457.
- Mitani, A., & Shattock, M. J. (1992). Role of Na-activated K channel, Na-K-Cl cotransport, and Na-K pump in [K]<sup>e</sup> changes during ischemia in rat heart. *Am J Physiol*, *263*(2 Pt 2), H333-340.
- Moller, R. S., Heron, S. E., Larsen, L. H., Lim, C. X., Ricos, M. G., Bayly, M. A., van Kempen, M. J., Klinkenberg, S., Andrews, I., Kelley, K., Ronen, G. M., Callen, D., McMahon, J. M., Yendle, S. C., Carvill, G. L., Mefford, H. C., Nabbout, R., Poduri, A., Striano, P., Baglietto, M. G., Zara, F., Smith, N. J., Pridmore, C., Gardella, E., Nikanorova, M., Dahl, H. A., Gellert, P., Scheffer, I. E., Gunning, B., Kragh-Olsen, B., & Dibbens, L. M. (2015). Mutations in KCNT1 cause a spectrum of focal epilepsies. *Epilepsia*, *56*(9), e114-120.
- Mondillo, S., Galderisi, M., Mele, D., Cameli, M., Lomoriello, V. S., Zaca, V., Ballo, P., D'Andrea, A., Muraru, D., Losi, M., Agricola, E., D'Errico, A., Buralli, S., Sciomer, S., Nistri, S., Badano, L., & Echocardiography Study Group Of The Italian Society Of, C. (2011). Speckle-tracking echocardiography: a new technique for assessing myocardial function. *J Ultrasound Med*, *30*(1), 71-83.
- Moran, A. E., Forouzanfar, M. H., Roth, G. A., Mensah, G. A., Ezzati, M., Flaxman, A., Murray, C. J., & Naghavi, M. (2014). The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*, *129*(14), 1493-1501.
- Moran, A. E., Oliver, J. T., Mirzaie, M., Forouzanfar, M. H., Chilov, M., Anderson, L., Morrison, J. L., Khan, A., Zhang, N., Haynes, N., Tran, J., Murphy, A., Degennaro, V., Roth, G., Zhao, D., Peer, N., Pichon-Riviere, A., Rubinstein, A., Pogosova, N., Prabhakaran, D., Naghavi, M., Ezzati, M., & Mensah, G. A. (2012). Assessing the Global Burden of Ischemic Heart Disease: Part 1: Methods for a Systematic Review of the Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010. *Glob Heart*, *7*(4), 315-329.
- Mori, K., Kobayashi, S., Saito, T., Masuda, Y., & Nakaya, H. (1998). Inhibitory effects of class I and IV antiarrhythmic drugs on the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel current in guinea pig ventricular cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *358*(6), 641-648.
- Mullen, S. A., Carney, P. W., Roten, A., Ching, M., Lightfoot, P. A., Churilov, L., Nair, U., Li, M., Berkovic, S. F., Petrou, S., & Scheffer, I. E. (2018). Precision therapy for epilepsy due to KCNT1 mutations: A randomized trial of oral quinidine. *Neurology*, *90*(1), e67-e72.
- Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, F., Dorn, G. W., 2nd, Kitsis, R. N., Otsu, K., Ping, P., Rizzuto, R., Sack, M. N., Wallace, D., Youle, R. J., American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, C. o. C. C., Council on Functional, G., & Translational, B. (2016). Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res*, *118*(12), 1960-1991.
- Murphy, E., & Eisner, D. A. (2009). Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. *Circ Res*, *104*(3), 292-303.
- Murphy, S., & Frishman, W. H. (2005). Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev*, *13*(1), 3-12.
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, *74*(5), 1124-1136.
- Nanou, E., & El Manira, A. (2010). Mechanisms of modulation of AMPA-induced Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> current by mGluR1. *J Neurophysiol*, *103*(1), 441-445.
- Nanou, E., Kyriakatos, A., Bhattacharjee, A., Kaczmarek, L. K., Paratcha, G., & El Manira, A. (2008). Na<sup>+</sup>-mediated coupling between AMPA receptors and KNa channels shapes synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(52), 20941-20946.
- Nattel, S., Maguy, A., Le Bouter, S., & Yeh, Y. H. (2007). Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*, *87*(2), 425-456.
- Nattel, S., Yue, L., & Wang, Z. (1999). Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem*, *9*(4-5), 217-226.
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, *85*(4), 1205-1253.
- Nguyen, T. Q., Maalouf, N. M., Sakhaee, K., & Moe, O. W. (2011). Comparison of insulin action on glucose versus potassium uptake in humans. *Clin J Am Soc Nephrol*, *6*(7), 1533-1539.
- Nichols, C. G., Singh, G. K., & Grange, D. K. (2013). KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res*, *112*(7), 1059-1072.
- Nuwer, M. O., Picchione, K. E., & Bhattacharjee, A. (2010). PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *J Neurosci*, *30*(42), 14165-14172.
- O'Connell, T. D., Rodrigo, M. C., & Simpson, P. C. (2007). Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*, *357*, 271-296.
- O'Rourke, B. (2004). Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*, *94*(4), 420-432.
- Ohba, C., Kato, M., Takahashi, N., Osaka, H., Shiihara, T., Tohyama, J., Nabatame, S., Azuma, J., Fujii, Y., Hara, M., Tsurusawa, R., Inoue, T., Ogata, R., Watanabe, Y., Togashi, N., Kodera, H., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Tanaka, F., Saito, H., & Matsumoto, N. (2015). De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, *56*(9), e121-128.

- Ohnuma, Y., Miura, T., Miki, T., Tanno, M., Kuno, A., Tsuchida, A., & Shimamoto, K. (2002). Opening of mitochondrial K(ATP) channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(1), H440-447.
- Oldenburg, O., Cohen, M. V., Yellon, D. M., & Downey, J. M. (2002). Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*, *55*(3), 429-437.
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X. M., Philipp, S., Critz, S. D., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (2004). Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *286*(1), H468-476.
- Olney, J. W. (1989). Glutamate, a neurotoxic transmitter. *J Child Neurol*, *4*(3), 218-226.
- Ong, S. B., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X. Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*, *186*, 73-87.
- Ortega-Gomez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, *5*(5), 661-674.
- Ostadal, B., & Ostadal, P. (2014). Sex-based differences in cardiac ischaemic injury and protection: therapeutic implications. *Br J Pharmacol*, *171*(3), 541-554.
- Otsuka, F., Yasuda, S., Noguchi, T., & Ishibashi-Ueda, H. (2016). Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*, *6*(4), 396-408.
- Paggio, A., Checchetto, V., Campo, A., Menabò, R., Di Marco, G., Di Lisa, F., Szabo, I., Rizzuto, R., & De Stefani, D. (2019). Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature*, *572*(7771), 609-613.
- Palatini, P., & Julius, S. (1997). Heart rate and the cardiovascular risk. *J Hypertens*, *15*(1), 3-17.
- Palmer, B. F. (2004). Managing hyperkalemia caused by inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system. *N Engl J Med*, *351*(6), 585-592.
- Palmer, B. F. (2015). Regulation of Potassium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*, *10*(6), 1050-1060.
- Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2016). Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. *Adv Physiol Educ*, *40*(4), 480-490.
- Paulais, M., Lachheb, S., & Teulon, J. (2006). A Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in the thick ascending limb of mouse kidney. *J Gen Physiol*, *127*(2), 205-215.
- Pearson, R. D., & Hewlett, E. L. (1985). Niclosamide therapy for tapeworm infections. *Ann Intern Med*, *102*(4), 550-551.
- Pfeiffer, E. R., Tangney, J. R., Omens, J. H., & McCulloch, A. D. (2014). Biomechanics of cardiac electromechanical coupling and mechanoelectric feedback. *J Biomech Eng*, *136*(2), 021007.
- Pike, M. M., Luo, C. S., Clark, M. D., Kirk, K. A., Kitakaze, M., Madden, M. C., Cragoe, E. J., Jr., & Pohost, G. M. (1993). NMR measurements of Na<sup>+</sup> and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol*, *265*(6 Pt 2), H2017-2026.
- Ping, P., Song, C., Zhang, J., Guo, Y., Cao, X., Li, R. C., Wu, W., Vondriska, T. M., Pass, J. M., Tang, X. L., Pierce, W. M., & Bolli, R. (2002). Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection. *J Clin Invest*, *109*(4), 499-507.
- Ping, P., Zhang, J., Pierce, W. M., Jr., & Bolli, R. (2001). Functional proteomic analysis of protein kinase C epsilon signaling complexes in the normal heart and during cardioprotection. *Circ Res*, *88*(1), 59-62.
- Ping, P., Zhang, J., Qiu, Y., Tang, X. L., Manchikalapudi, S., Cao, X., & Bolli, R. (1997). Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res*, *81*(3), 404-414.
- Piper, H. M., Abdallah, Y., & Schafer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, *61*(3), 365-371.
- Piper, H. M., Garcia-Dorado, D., & Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, *38*(2), 291-300.
- Piper, H. M., Meuter, K., & Schafer, C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, *75*(2), S644-648.
- Pistner, A., Belmonte, S., Coulthard, T., & Blaxall, B. (2010). Murine echocardiography and ultrasound imaging. *J Vis Exp*(42).
- Pivovarov, A. S., Calahorra, F., & Walker, R. J. (2018). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci*, *19*(1), 1.
- Poburko, D., Liao, C. H., Lemos, V. S., Lin, E., Maruyama, Y., Cole, W. C., & van Breemen, C. (2007). Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na<sup>+</sup>] transients drive Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells. *Circ Res*, *101*(10), 1030-1038.
- Portal, L., Martin, V., Assaly, R., d'Anglemont de Tassigny, A., Michineau, S., Berdeaux, A., Ghaleh, B., & Pons, S. (2013). A model of hypoxia-reoxygenation on isolated adult mouse cardiomyocytes: characterization, comparison with ischemia-reperfusion, and application to the cardioprotective effect of regular treadmill exercise. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, *18*(4), 367-375.
- Post, R. L., & Jolly, P. C. (1957). The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*, *25*(1), 118-128.
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, *119*(1), 91-112.

- Pravdic, D., Sedlic, F., Mio, Y., Vlastic, N., Bienengraeber, M., & Bosnjak, Z. J. (2009). Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology*, *111*(2), 267-274.
- Prunier, F., Kawase, Y., Gianni, D., Scapin, C., Danik, S. B., Ellinor, P. T., Hajjar, R. J., & Del Monte, F. (2008). Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation*, *118*(6), 614-624.
- Puchtler, H., & Isler, H. (1958). The effect of phosphomolybdic acid on the stainability of connective tissues by various dyes. *J Histochem Cytochem*, *6*(4), 265-270.
- Puchtler, H., Waldrop, F. S., & Valentine, L. S. (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol*, *150*(2), 174-187.
- Pugach, E. K., Richmond, P. A., Azofeifa, J. G., Dowell, R. D., & Leinwand, L. A. (2015). Prolonged Cre expression driven by the alpha-myosin heavy chain promoter can be cardiotoxic. *J Mol Cell Cardiol*, *86*, 54-61.
- Quraishi, I. H., Mercier, M. R., McClure, H., Couture, R. L., Schwartz, M. L., Lukowski, R., Ruth, P., & Kaczmarek, L. K. (2020). Impaired motor skill learning and altered seizure susceptibility in mice with loss or gain of function of the *Kcnt1* gene encoding Slack (KNa1.1) Na(+)-activated K(+) channels. *Sci Rep*, *10*(1), 3213.
- Rai, V., Sharma, P., Agrawal, S., & Agrawal, D. K. (2017). Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem*, *424*(1-2), 123-145.
- Raphael, J., Abedat, S., Rivo, J., Meir, K., Beeri, R., Pugatsch, T., Zuo, Z., & Gozal, Y. (2006). Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J Pharmacol Exp Ther*, *318*(1), 186-194.
- Raphael, J., Rivo, J., & Gozal, Y. (2005). Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br J Anaesth*, *95*(6), 756-763.
- Redel, A., Lange, M., Jazbutyte, V., Lotz, C., Smul, T. M., Roewer, N., & Kehl, F. (2008). Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesth Analg*, *106*(2), 384-391, table of contents.
- Redel, A., Stumpner, J., Tischer-Zeitz, T., Lange, M., Smul, T. M., Lotz, C., Roewer, N., & Kehl, F. (2009). Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*, *234*(10), 1186-1191.
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, *56*(5), 786-794.
- Respress, J. L., & Wehrens, X. H. (2010). Transthoracic echocardiography in mice. *J Vis Exp*(39).
- Rezkalla, S. H., & Kloner, R. A. (2004). Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, *1*(2), 96-102.
- Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S., & Wiskich, J. T. (2001). The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol Lett*, *202*(2), 181-187.
- Rizzi, S., Knaus, H. G., & Schwarzer, C. (2016). Differential distribution of the sodium-activated potassium channels *slack* and *hcn2* in mouse brain. *J Comp Neurol*, *524*(10), 2093-2116.
- Robinson, R. B., & Siegelbaum, S. A. (2003). Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol*, *65*, 453-480.
- Roscoe, A. K., Christensen, J. D., & Lynch, C., 3rd. (2000). Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology*, *92*(6), 1692-1701.
- Rose, C. R. (2002). Na<sup>+</sup> signals at central synapses. *Neuroscientist*, *8*(6), 532-539.
- Rose, C. R., & Konnerth, A. (2001). NMDA receptor-mediated Na<sup>+</sup> signals in spines and dendrites. *J Neurosci*, *21*(12), 4207-4214.
- Rossello, X., & Yellon, D. M. (2018). The RISK pathway and beyond. *Basic Res Cardiol*, *113*(1), 2.
- Roth, D. M., Swaney, J. S., Dalton, N. D., Gilpin, E. A., & Ross, J., Jr. (2002). Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *282*(6), H2134-2140.
- Roth, S., Torregroza, C., Feige, K., Preckel, B., Hollmann, M. W., Weber, N. C., & Huhn, R. (2021). Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*, *22*(5).
- Ruffin, V. A., Gu, X. Q., Zhou, D., Douglas, R. M., Sun, X., Trouth, C. O., & Haddad, G. G. (2008). The sodium-activated potassium channel Slack is modulated by hypercapnia and acidosis. *Neuroscience*, *151*(2), 410-418.
- Rusinkevich, V., Huang, Y., Chen, Z. Y., Qiang, W., Wang, Y. G., Shi, Y. F., & Yang, H. T. (2019). Temporal dynamics of immune response following prolonged myocardial ischemia/reperfusion with and without cyclosporine A. *Acta Pharmacol Sin*, *40*(9), 1168-1183.
- Rutledge, C., Cater, G., McMahon, B., Guo, L., Nouraie, S. M., Wu, Y., Villanueva, F., & Kaufman, B. A. (2020). Commercial 4-dimensional echocardiography for murine heart volumetric evaluation after myocardial infarction. *Cardiovasc Ultrasound*, *18*(1), 9.
- Safronov, B. V., & Vogel, W. (1996). Properties and functions of Na(+)-activated K<sup>+</sup> channels in the soma of rat motoneurons. *J Physiol*, *497* ( Pt 3), 727-734.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., & Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*, *7*(12), 921-931.

- Salloum, F. N., Das, A., Samidurai, A., Hoke, N. N., Chau, V. Q., Ockaili, R. A., Stasch, J. P., & Kukreja, R. C. (2012). Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*(6), H1347-1354.
- Santi, C. M., Ferreira, G., Yang, B., Gazula, V. R., Butler, A., Wei, A., Kaczmarek, L. K., & Salkoff, L. (2006). Opposite regulation of Slick and Slack K<sup>+</sup> channels by neuromodulators. *J Neurosci*, *26*(19), 5059-5068.
- Sarwar, C. M., Papadimitriou, L., Pitt, B., Pina, I., Zannad, F., Anker, S. D., Gheorghide, M., & Butler, J. (2016). Hyperkalemia in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*, *68*(14), 1575-1589.
- Sato, T., Sasaki, N., Seharaseyon, J., O'Rourke, B., & Marban, E. (2000). Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation*, *101*(20), 2418-2423.
- Schaum, N., Karkanas, J., Neff, N. F., May, A. P., Quake, S. R., Wyss-Coray, T., Darmanis, S., Batson, J., Botvinnik, O., Chen, M. B., Chen, S., Green, F., Jones, R. C., Maynard, A., Penland, L., Pisco, A. O., Sit, R. V., Stanley, G. M., Webber, J. T., Zanini, F., Baghel, A. S., Bakerman, I., Bansal, I., Berdnik, D., Bilen, B., Brownfield, D., Cain, C., Chen, M. B., Chen, S., Cho, M., Cirolia, G., Conley, S. D., Darmanis, S., Demers, A., Demir, K., de Morree, A., Divita, T., du Bois, H., Dulgeroff, L. B. T., Ebadi, H., Espinoza, F. H., Fish, M., Gan, Q., George, B. M., Gillich, A., Green, F., Genetiano, G., Gu, X., Gulati, G. S., Hang, Y., Hosseinzadeh, S., Huang, A., Iram, T., Isobe, T., Ives, F., Jones, R. C., Kao, K. S., Karnam, G., Kershner, A. M., Kiss, B. M., Kong, W., Kumar, M. E., Lam, J. Y., Lee, D. P., Lee, S. E., Li, G., Li, Q., Liu, L., Lo, A., Lu, W.-J., Manjunath, A., May, A. P., May, K. L., May, O. L., Maynard, A., McKay, M., Metzger, R. J., Mignardi, M., Min, D., Nabhan, A. N., Neff, N. F., Ng, K. M., Noh, J., Patkar, R., Peng, W. C., Penland, L., Puccinelli, R., Rulifson, E. J., Schaum, N., Sikandar, S. S., Sinha, R., Sit, R. V., Szade, K., Tan, W., Tato, C., Tellez, K., Travaglini, K. J., Tropini, C., Waldburger, L., van Weele, L. J., Wosczyzna, M. N., Xiang, J., Xue, S., Youngyunpipatkul, J., Zanini, F., Zardeneta, M. E., Zhang, F., Zhou, L., Bansal, I., Chen, S., Cho, M., Cirolia, G., Darmanis, S., Demers, A., Divita, T., Ebadi, H., Genetiano, G., Green, F., Hosseinzadeh, S., Ives, F., Lo, A., May, A. P., Maynard, A., McKay, M., Neff, N. F., Penland, L., Sit, R. V., Tan, W., Waldburger, L., Youngyunpipatkul, J., Batson, J., Botvinnik, O., Castro, P., Croote, D., Darmanis, S., DeRisi, J. L., Karkanas, J., Pisco, A. O., Stanley, G. M., Webber, J. T., Zanini, F., Baghel, A. S., Bakerman, I., Batson, J., Bilen, B., Botvinnik, O., Brownfield, D., Chen, M. B., Darmanis, S., Demir, K., de Morree, A., Ebadi, H., Espinoza, F. H., Fish, M., Gan, Q., George, B. M., Gillich, A., Gu, X., Gulati, G. S., Hang, Y., Huang, A., Iram, T., Isobe, T., Karnam, G., Kershner, A. M., Kiss, B. M., Kong, W., Kuo, C. S., Lam, J. Y., Lehallier, B., Li, G., Li, Q., Liu, L., Lu, W.-J., Min, D., Nabhan, A. N., Ng, K. M., Nguyen, P. K., Patkar, R., Peng, W. C., Penland, L., Rulifson, E. J., Schaum, N., Sikandar, S. S., Sinha, R., Szade, K., Tan, S. Y., Tellez, K., Travaglini, K. J., Tropini, C., van Weele, L. J., Wang, B. M., Wosczyzna, M. N., Xiang, J., Yousef, H., Zhou, L., Batson, J., Botvinnik, O., Chen, S., Darmanis, S., Green, F., May, A. P., Maynard, A., Pisco, A. O., Quake, S. R., Schaum, N., Stanley, G. M., Webber, J. T., Wyss-Coray, T., Zanini, F., Beachy, P. A., Chan, C. K. F., de Morree, A., George, B. M., Gulati, G. S., Hang, Y., Huang, K. C., Iram, T., Isobe, T., Kershner, A. M., Kiss, B. M., Kong, W., Li, G., Li, Q., Liu, L., Lu, W.-J., Nabhan, A. N., Ng, K. M., Nguyen, P. K., Peng, W. C., Rulifson, E. J., Schaum, N., Sikandar, S. S., Sinha, R., Szade, K., Travaglini, K. J., Tropini, C., Wang, B. M., Weinberg, K., Wosczyzna, M. N., Wu, S. M., Yousef, H., Barres, B. A., Beachy, P. A., Chan, C. K. F., Clarke, M. F., Darmanis, S., Huang, K. C., Karkanas, J., Kim, S. K., Krasnow, M. A., Kumar, M. E., Kuo, C. S., May, A. P., Metzger, R. J., Neff, N. F., Nusse, R., Nguyen, P. K., Rando, T. A., Sonnenburg, J., Wang, B. M., Weinberg, K., Weissman, I. L., Wu, S. M., Quake, S. R., Wyss-Coray, T., The Tabula Muris, C., Overall, c., Logistical, c., Organ, c., processing, Library, p., sequencing, Computational data, a., Cell type, a., Writing, g., Supplemental text writing, g., & Principal, i. (2018). Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature*, *562*(7727), 367-372.
- Schmidt, K., Tissier, R., Ghaleh, B., Drogies, T., Felix, S. B., & Krieg, T. (2010). Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. *Eur Heart J*, *31*(13), 1655-1662.
- Schmitt, N., Grunnet, M., & Olesen, S. P. (2014). Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev*, *94*(2), 609-653.
- Schott, R. J., Rohmann, S., Braun, E. R., & Schaper, W. (1990). Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*, *66*(4), 1133-1142.
- Schulman, D., Latchman, D. S., & Yellon, D. M. (2002). Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(4), H1481-1488.
- Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z., & Gross, G. J. (1995). Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*, *268*(5 Pt 2), H2157-2161.
- Schulz, R., Gres, P., Skyschally, A., Duschin, A., Belosjorow, S., Konietzka, I., & Heusch, G. (2003). Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *FASEB J*, *17*(10), 1355-1357.
- Schwanke, U., Konietzka, I., Duschin, A., Li, X., Schulz, R., & Heusch, G. (2002). No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(4), H1740-1742.
- Schwenk, F., Baron, U., & Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, *23*(24), 5080-5081.
- Schwindt, P. C., Spain, W. J., & Crill, W. E. (1989). Long-lasting reduction of excitability by a sodium-dependent potassium current in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol*, *61*(2), 233-244.
- Schwinger, R. H., & Erdmann, E. (1992). Heart failure and electrolyte disturbances. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, *14*(4), 315-325.

- Semb, S. O., Lunde, P. K., Holt, E., Tonnessen, T., Christensen, G., & Sejersted, O. M. (1998). Reduced myocardial Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, *30*(7), 1311-1328.
- Shinde, A. V., & Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*, *70*, 74-82.
- Singh, H. (2021). Mitochondrial ion channels in cardiac function. *Am J Physiol Cell Physiol*, *321*(5), C812-C825.
- Singh, H., Lu, R., Bopassa, J. C., Meredith, A. L., Stefani, E., & Toro, L. (2013). MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(26), 10836-10841.
- Sitia, S., Tomasoni, L., & Turiel, M. (2010). Speckle tracking echocardiography: A new approach to myocardial function. *World J Cardiol*, *2*(1), 1-5.
- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*, *1*, 41-55.
- Smith, C. O., Nehrke, K., & Brookes, P. S. (2017). The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection. *Biochem J*, *474*(12), 2067-2094.
- Smith, C. O., Wang, Y. T., Nadtochiy, S. M., Miller, J. H., Jonas, E. A., Dirksen, R. T., Nehrke, K., & Brookes, P. S. (2018). Cardiac metabolic effects of KNa1.2 channel deletion and evidence for its mitochondrial localization. *FASEB J*, fj201800139R.
- Smith, S. J. (2005). EEG in the diagnosis, classification, and management of patients with epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *76* Suppl 2, ii2-7.
- Soltysinska, E., Bentzen, B. H., Barthmes, M., Hattel, H., Thrush, A. B., Harper, M. E., Qvortrup, K., Larsen, F. J., Schiffer, T. A., Losa-Reyna, J., Straubinger, J., Kniess, A., Thomsen, M. B., Brüggemann, A., Fenske, S., Biel, M., Ruth, P., Wahl-Schott, C., Boushel, R. C., Olesen, S. P., & Lukowski, R. (2014). KCNMA1 Encoded Cardiac BK Channels Afford Protection against Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One*, *9*(7), e103402.
- Sonner, J. M., Gong, D., & Eger, E. I., 2nd. (2000). Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains. *Anesth Analg*, *91*(3), 720-726.
- Spitznagel, B. D., Mishra, N. M., Qunies, A. M., Prael, F. J., 3rd, Du, Y., Kozek, K. A., Lazarenko, R. M., Denton, J. S., Emmitte, K. A., & Weaver, C. D. (2020). VU0606170, a Selective Slack Channels Inhibitor, Decreases Calcium Oscillations in Cultured Cortical Neurons. *ACS Chem Neurosci*, *11*(21), 3658-3671.
- Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T. T., L'Huillier, I., Aupetit, J. F., Bonnefoy, E., Finet, G., Andre-Fouet, X., & Ovize, M. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation*, *112*(14), 2143-2148.
- Stanton, T., Leano, R., & Marwick, T. H. (2009). Prediction of all-cause mortality from global longitudinal speckle strain: comparison with ejection fraction and wall motion scoring. *Circ Cardiovasc Imaging*, *2*(5), 356-364.
- Stowe, D. F., Yang, M., Heisner, J. S., & Camara, A. K. S. (2017). Endogenous and Agonist-induced Opening of Mitochondrial Big Versus Small Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> Channels on Cardiac Cell and Mitochondrial Protection. *J Cardiovasc Pharmacol*, *70*(5), 314-328.
- Sugishita, K., Su, Z., Li, F., Philipson, K. D., & Barry, W. H. (2001). Gender influences [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during metabolic inhibition in myocytes overexpressing the Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>(2+)</sup> exchanger. *Circulation*, *104*(17), 2101-2106.
- Sun, Y., Wallrabe, H., Seo, S. A., & Periasamy, A. (2011). FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Forster on the 100th anniversary of his birth. *Chemphyschem*, *12*(3), 462-474.
- Sutton, M. G., & Sharpe, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, *101*(25), 2981-2988.
- Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Seino, S., Marban, E., & Nakaya, H. (2002). Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*, *109*(4), 509-516.
- Sweat, F., Puchtler, H., & Rosenthal, S. I. (1964). Sirius Red F3ba as a Stain for Connective Tissue. *Arch Pathol*, *78*, 69-72.
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*, *125*(Pt 4), 807-815.
- Takeuchi, T., Duzkiewicz, A. J., & Morris, R. G. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *369*(1633), 20130288.
- Tamsett, T. J., Picchione, K. E., & Bhattacharjee, A. (2009). NAD<sup>+</sup> activates KNa channels in dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, *29*(16), 5127-5134.
- Tanaka, K., Kersten, J. R., & Riess, M. L. (2014). Opioid-induced cardioprotection. *Curr Pharm Des*, *20*(36), 5696-5705.
- Tang, Q. Y., Zhang, F. F., Xu, J., Wang, R., Chen, J., Logothetis, D. E., & Zhang, Z. (2016). Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms. *Cell Rep*, *14*(1), 129-139.
- Tee, N., Gu, Y., Murni, & Shim, W. (2015). Comparative myocardial deformation in 3 myocardial layers in mice by speckle tracking echocardiography. *Biomed Res Int*, *2015*, 148501.
- Tejada, M. A., Hashem, N., Calloe, K., & Klaerke, D. A. (2017). Heteromeric Slick/Slack K<sup>+</sup> channels show graded sensitivity to cell volume changes. *PLoS One*, *12*(2), e0169914.
- Thal, S. C., & Plesnila, N. (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO<sub>2</sub> during surgical anesthesia in mice. *J Neurosci Methods*, *159*(2), 261-267.
- Thibault, H., Piot, C., Staat, P., Bontemps, L., Sportouch, C., Rioufol, G., Cung, T. T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., Aupetit, J. F., Finet, G., Andre-Fouet, X., Macia, J. C., Raczka, F., Rossi, R., Itti, R., Kirkorian, G., Derumeaux, G., & Ovize, M. (2008). Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*, *117*(8), 1037-1044.

- Thier, S. O. (1986). Potassium physiology. *Am J Med*, 80(4A), 3-7.
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), 187-200.
- Thomson, S. J., Hansen, A., & Sanguinetti, M. C. (2015). Identification of the Intracellular Na<sup>+</sup> Sensor in Slo2.1 Potassium Channels. *J Biol Chem*, 290(23), 14528-14535.
- Thuny, F., Lairez, O., Roubille, F., Mewton, N., Rioufol, G., Sportouch, C., Sanchez, I., Bergerot, C., Thibault, H., Cung, T. T., Finet, G., Argaud, L., Revel, D., Derumeaux, G., Bonnefoy-Cudraz, E., Elbaz, M., Piot, C., Ovize, M., & Croisille, P. (2012). Post-conditioning reduces infarct size and edema in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 59(24), 2175-2181.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., & Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial, I. (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*, 72(18), 2231-2264.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. t. U. D. o. M. I., Katus, H. A., Lindahl, B., Morrow, D. A., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, R. O., Pinto, F., Gibbons, R. J., Fox, K. A., Atar, D., Newby, L. K., Galvani, M., Hamm, C. W., Uretsky, B. F., Steg, P. G., Wijns, W., Bassand, J. P., Menasche, P., Ravkilde, J., Ohman, E. M., Antman, E. M., Wallentin, L. C., Armstrong, P. W., Simoons, M. L., Januzzi, J. L., Nieminen, M. S., Gheorghide, M., Filippatos, G., Luepker, R. V., Fortmann, S. P., Rosamond, W. D., Levy, D., Wood, D., Smith, S. C., Hu, D., Lopez-Sendon, J. L., Robertson, R. M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A. A., Parkhomenko, A. N., Vasilieva, E. J., & Mendis, S. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 126(16), 2020-2035.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. t. R. o. M. I., Jaffe, A. S., Apple, F. S., Galvani, M., Katus, H. A., Newby, L. K., Ravkilde, J., Chaitman, B., Clemmensen, P. M., Dellborg, M., Hod, H., Porela, P., Underwood, R., Bax, J. J., Beller, G. A., Bonow, R., Van der Wall, E. E., Bassand, J. P., Wijns, W., Ferguson, T. B., Steg, P. G., Uretsky, B. F., Williams, D. O., Armstrong, P. W., Antman, E. M., Fox, K. A., Hamm, C. W., Ohman, E. M., Simoons, M. L., Poole-Wilson, P. A., Gurfinkel, E. P., Lopez-Sendon, J. L., Pais, P., Mendis, S., Zhu, J. R., Wallentin, L. C., Fernandez-Aviles, F., Fox, K. M., Parkhomenko, A. N., Priori, S. G., Tendera, M., Voipio-Pulkki, L. M., Vahanian, A., Camm, A. J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellemans, I., Kristensen, S. D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J. L., Morais, J., Brener, S., Harrington, R., Morrow, D., Lim, M., Martinez-Rios, M. A., Steinhubl, S., Levine, G. N., Gibler, W. B., Goff, D., Tubaro, M., Dudek, D., & Al-Attar, N. (2007). Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*, 116(22), 2634-2653.
- Thygesen, K., Mair, J., Katus, H., Plebani, M., Venge, P., Collinson, P., Lindahl, B., Giannitsis, E., Hasin, Y., Galvani, M., Tubaro, M., Alpert, J. S., Biasucci, L. M., Koenig, W., Mueller, C., Huber, K., Hamm, C., Jaffe, A. S., & Study Group on Biomarkers in Cardiology of the, E. S. C. W. G. o. A. C. C. (2010). Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J*, 31(18), 2197-2204.
- Timmers, L., Sluijter, J. P., van Keulen, J. K., Hoefler, I. E., Nederhoff, M. G., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., van Echteld, C. J., Joles, J. A., Quax, P. H., Piek, J. J., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. (2008). Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*, 102(2), 257-264.
- Toller, W. G., Kersten, J. R., Gross, E. R., Pagel, P. S., & Wartier, D. C. (2000). Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology*, 92(5), 1400-1407.
- Toma, O., Weber, N. C., Wolter, J. I., Obal, D., Preckel, B., & Schlack, W. (2004). Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology*, 101(6), 1372-1380.
- Tomasello, D. L., Hurley, E., Wrabetz, L., & Bhattacharjee, A. (2017). Slick (Kcnt2) Sodium-Activated Potassium Channels Limit Peptidergic Nociceptor Excitability and Hyperalgesia. *J Exp Neurosci*, 11, 1179069517726996.
- Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2000). Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*, 87(4), 309-315.
- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*, 90(4), 377-379.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Tsang, A., Hausenloy, D. J., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2004). Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*, 95(3), 230-232.
- Tsuchida, K., Hirose, H., Ozawa, S., Ishida, H., Iwatani, T., & Matsumoto, U. (2021). Monensin-Induced Increase in Intracellular Na<sup>+</sup> Induces Changes in Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Currents and Regulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Transport in Cardiomyocytes. *Pharmacology*, 106(1-2), 91-105.
- Tsutsumi, Y. M., Patel, H. H., Lai, N. C., Takahashi, T., Head, B. P., & Roth, D. M. (2006). Isoflurane produces sustained cardiac protection after ischemia-reperfusion injury in mice. *Anesthesiology*, 104(3), 495-502.

- Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Hirasawa, T., Yanai, S., Nakamura, Y., Ondo, Y., & Kohsaka, S. (2003). Slo2 sodium-activated K<sup>+</sup> channels bind to the PDZ domain of PSD-95. *Biochem Biophys Res Commun*, *310*(4), 1140-1147.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takananen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., & Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220), 1260419.
- Van Allen, N. R., Krafft, P. R., Leitzke, A. S., Applegate, R. L., 2nd, Tang, J., & Zhang, J. H. (2012). The role of Volatile Anesthetics in Cardioprotection: a systematic review. *Med Gas Res*, *2*(1), 22.
- van Echteld, C. J., Kirkels, J. H., Eijgelshoven, M. H., van der Meer, P., & Ruigrok, T. J. (1991). Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a <sup>23</sup>Na NMR study. *J Mol Cell Cardiol*, *23*(3), 297-307.
- Van Emous, J. G., Vleggeert-Lankamp, C. L., Nederhoff, M. G., Ruigrok, T. J., & Van Echteld, C. J. (2001). Postischemic Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase reactivation is delayed in the absence of glycolytic ATP in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *280*(5), H2189-2195.
- van Hout, G. P., Arslan, F., Pasterkamp, G., & Hoefer, I. E. (2016). Targeting danger-associated molecular patterns after myocardial infarction. *Expert Opin Ther Targets*, *20*(2), 223-239.
- van Velzen, M., Dahan, A., & Niesters, M. (2020). Neuropathic Pain: Challenges and Opportunities. *Front Pain Res (Lausanne)*, *1*, 1.
- Veech, R. L., Kashiwaya, Y., & King, M. T. (1995). The resting membrane potential of cells are measures of electrical work, not of ionic currents. *Integr Physiol Behav Sci*, *30*(4), 283-307.
- Veldkamp, M. W., Vereecke, J., & Carmeliet, E. (1994). Effects of intracellular sodium and hydrogen ion on the sodium activated potassium channel in isolated patches from guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, *28*(7), 1036-1041.
- Venugopal, H., Hanna, A., Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2022). Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells*, *11*(9).
- Visseren, F. L. J., Mach, F., Smulders, Y. M., Carballo, D., Koskinas, K. C., Back, M., Benetos, A., Biffi, A., Boavida, J. M., Capodanno, D., Cosyns, B., Crawford, C., Davos, C. H., Desormais, I., Di Angelantonio, E., Franco, O. H., Halvorsen, S., Hobbs, F. D. R., Hollander, M., Jankowska, E. A., Michal, M., Sacco, S., Sattar, N., Tokgozoglu, L., Tonstad, S., Tsioufis, K. P., van Dis, I., van Gelder, I. C., Wannier, C., Williams, B., Societies, E. S. C. N. C., & Group, E. S. C. S. D. (2021). 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*, *42*(34), 3227-3337.
- Wall, T. M., Sheehy, R., & Hartman, J. C. (1994). Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*, *270*(2), 681-689.
- Walsh-Wilkinson, E., Arsenault, M., & Couet, J. (2021). Segmental analysis by speckle-tracking echocardiography of the left ventricle response to isoproterenol in male and female mice. *PeerJ*, *9*, e11085.
- Wang, X., Guo, Z., Ding, Z., & Mehta, J. L. (2018). Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*, *7*(9).
- Wang, X., Lauth, A., Wan, T. C., Lough, J. W., & Auchampach, J. A. (2020). Myh6-driven Cre recombinase activates the DNA damage response and the cell cycle in the myocardium in the absence of loxP sites. *Dis Model Mech*, *13*(12).
- Wang, X., Liang, B., Skibsbjerg, L., Olesen, S. P., Grunnet, M., & Jespersen, T. (2013). GIRK channel activation via adenosine or muscarinic receptors has similar effects on rat atrial electrophysiology. *J Cardiovasc Pharmacol*, *62*(2), 192-198.
- Wang, X., Liu, J., Drummond, C. A., & Shapiro, J. I. (2017). Sodium potassium adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) as a therapeutic target for uremic cardiomyopathy. *Expert Opin Ther Targets*, *21*(5), 531-541.
- Wartier, D. C., al-Wathiqui, M. H., Kampine, J. P., & Schmeling, W. T. (1988). Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology*, *69*(4), 552-565.
- Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci*, *17*(2), 153-163.
- Wieland, A., Trageser, D., Gogolok, S., Reinartz, R., Hofer, H., Keller, M., Leinhaas, A., Schelle, R., Normann, S., Klaas, L., Waha, A., Koch, P., Fimmers, R., Pietsch, T., Yachnis, A. T., Pincus, D. W., Steindler, D. A., Brustle, O., Simon, M., Glas, M., & Scheffler, B. (2013). Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, *19*(15), 4124-4136.
- Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Burns, R., Rayner, M., & Townsend, N. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Network, Brussels*.
- Wojtovich, A. P., Sherman, T. A., Nadtochiy, S. M., Urcioli, W. R., Brookes, P. S., & Nehrke, K. (2011). Slo-2 is cytoprotective and contributes to mitochondrial potassium transport. *PLoS One*, *6*(12), e28287.
- Wojtovich, A. P., Smith, C. O., Urcioli, W. R., Wang, Y. T., Xia, X. M., Brookes, P. S., & Nehrke, K. (2016). Cardiac Slo2.1 Is Required for Volatile Anesthetic Stimulation of K<sup>+</sup> Transport and Anesthetic Preconditioning. *Anesthesiology*, *124*(5), 1065-1076.
- Wojtovich, A. P., Urcioli, W. R., Chatterjee, S., Fisher, A. B., Nehrke, K., & Brookes, P. S. (2013). Kir6.2 is not the mitochondrial KATP channel but is required for cardioprotection by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *304*(11), H1439-1445.

- Wright, S. H. (2004). Generation of resting membrane potential. *Adv Physiol Educ*, 28(1-4), 139-142.
- Wu, J., Yu, J., Xie, P., Maimaitili, Y., Wang, J., Yang, L., Ma, H., Zhang, X., Yang, Y., & Zheng, H. (2017). Sevoflurane postconditioning protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury via activation of the JAK2-STAT3 pathway. *PeerJ*, 5, e3196.
- Xu, Q., Li, Q. G., Fan, G. R., Liu, Q. H., Mi, F. L., & Liu, B. (2017). Protective effects of fentanyl preconditioning on cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats. *Braz J Med Biol Res*, 50(2), e5286.
- Yamada, S., Nelson, T. J., Kane, G. C., Martinez-Fernandez, A., Crespo-Diaz, R. J., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., & Terzic, A. (2013). Induced pluripotent stem cell intervention rescues ventricular wall motion disparity, achieving biological cardiac resynchronization post-infarction. *J Physiol*, 591(17), 4335-4349.
- Yamamura, K., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2005). Protein kinase C and preconditioning: role of the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(6), H2484-2490.
- Yang, A., Wang, X. Q., Sun, C. S., Wei, L., & Yu, S. P. (2005a). Inhibitory effects of clofilium on membrane currents associated with Ca channels, NMDA receptor channels and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in cortical neurons. *Pharmacology*, 73(3), 162-168.
- Yang, B., Desai, R., & Kaczmarek, L. K. (2007). Slack and Slick K(Na) channels regulate the accuracy of timing of auditory neurons. *J Neurosci*, 27(10), 2617-2627.
- Yang, B., Gribkoff, V. K., Pan, J., Damagnez, V., Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Bhattacharjee, A., Yan, Y., Sigworth, F. J., & Kaczmarek, L. K. (2006). Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels. *Neuropharmacology*, 51(4), 896-906.
- Yang, K. C., & Nerbonne, J. M. (2016). Mechanisms contributing to myocardial potassium channel diversity, regulation and remodeling. *Trends Cardiovasc Med*, 26(3), 209-218.
- Yang, T., Smith, J. A., Leake, B. F., Sanders, C. R., Meiler, J., & Roden, D. M. (2013). An allosteric mechanism for drug block of the human cardiac potassium channel KCNQ1. *Mol Pharmacol*, 83(2), 481-489.
- Yang, X. M., Philipp, S., Downey, J. M., & Cohen, M. V. (2005b). Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*, 100(1), 57-63.
- Yang, X. M., Proctor, J. B., Cui, L., Krieg, T., Downey, J. M., & Cohen, M. V. (2004). Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*, 44(5), 1103-1110.
- Yeap, X. Y., Dehn, S., Adelman, J., Lipsitz, J., & Thorp, E. B. (2013). Quantitation of acute necrosis after experimental myocardial infarction. *Methods Mol Biol*, 1004, 115-133.
- Yellon, D. M., & Baxter, G. F. (1995). A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol*, 27(4), 1023-1034.
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357(11), 1121-1135.
- Ytrehus, K., Liu, Y., & Downey, J. M. (1994). Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol*, 266(3 Pt 2), H1145-1152.
- Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., & Salkoff, L. (2000). SLO-2, a K<sup>+</sup> channel with an unusual Cl<sup>-</sup> dependence. *Nat Neurosci*, 3(8), 771-779.
- Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z. W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C. M., & Salkoff, L. (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron*, 37(5), 765-773.
- Zhang, L., Sukhareva, M., Barker, J. L., Maric, D., Hao, Y., Chang, Y. H., Ma, W., O'Shaughnessy, T., & Rubinow, D. R. (2005). Direct binding of estradiol enhances Slack (sequence like a calcium-activated potassium channel) channels' activity. *Neuroscience*, 131(2), 275-282.
- Zhang, M., Schulte, J. S., Heinick, A., Piccini, I., Rao, J., Quaranta, R., Zeuschner, D., Malan, D., Kim, K. P., Ropke, A., Sasse, P., Arauzo-Bravo, M., Seebohm, G., Scholer, H., Fabritz, L., Kirchhof, P., Muller, F. U., & Greber, B. (2015). Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: implications for in vitro maturation. *Stem Cells*, 33(5), 1456-1469.
- Zhang, Y., Brown, M. R., Hyland, C., Chen, Y., Kronengold, J., Fleming, M. R., Kohn, A. B., Moroz, L. L., & Kaczmarek, L. K. (2012). Regulation of neuronal excitability by interaction of fragile X mental retardation protein with slack potassium channels. *J Neurosci*, 32(44), 15318-15327.
- Zhang, Z., Rosenhouse-Dantsker, A., Tang, Q. Y., Noskov, S., & Logothetis, D. E. (2010). The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2.2 channels. *J Neurosci*, 30(22), 7554-7562.
- Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(2), H579-588.
- Zheng, J., Koh, X., Hua, F., Li, G., Larrick, J. W., & Bian, J. S. (2011). Cardioprotection induced by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res*, 89(1), 51-59.
- Zhou, F., Metzner, K., Engel, P., Balzulat, A., Sisignano, M., Ruth, P., Lukowski, R., Schmidtko, A., & Lu, R. (2022). Slack Potassium Channels Modulate TRPA1-Mediated Nociception in Sensory Neurons. *Cells*, 11(10).
- Zhu, Z., Burnett, C. M., Maksymov, G., Stepniak, E., Sierra, A., Subbotina, E., Anderson, M. E., Coetzee, W. A., Hodgson-Zingman, D. M., & Zingman, L. V. (2011). Reduction in number of sarcolemmal KATP channels slows cardiac action potential duration shortening under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 415(4), 637-641.

- Zicha, S., Fernandez-Velasco, M., Lonardo, G., L'Heureux, N., & Nattel, S. (2005). Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model. *Cardiovasc Res*, 66(3), 472-481.
- Zuurbier, C. J., Bertrand, L., Beauloye, C. R., Andreadou, I., Ruiz-Meana, M., Jespersen, N. R., Kula-Alwar, D., Prag, H. A., Eric Botker, H., Dambrova, M., Montessuit, C., Kaambre, T., Liepinsh, E., Brookes, P. S., & Krieg, T. (2020). Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 24(11), 5937-5954.

## 8 Publikationen und Kongressbeiträge

### 8.1 Publikationen

#### 2022

Langst, N., Adler, J., **Kuret, A.**, Peter, A., Ruth, P., Boldt, K., & Lukowski, R. (2022). Cysteine-Rich LIM-Only Protein 4 (CRP4) Promotes Atherogenesis in the ApoE(-/-) Mouse Model. *Cells*, 11(8).

Lukowski, R., Cruz Santos, M., **Kuret, A.**, & Ruth, P. (2022). cGMP and mitochondrial K(+) channels - Compartmentalized but closely connected in cardioprotection. *Br J Pharmacol*; 179(11): 2344-2360.

**Kuret, A.**, Bischof, H., Längst, N., Schanz, S., Luczak, A., Yang, J., Bork, N.I., Cruz Santos, M., Zhou, X., Burgstaller, S., Malli, R., Schmidtko, A., Gawaz, M., Nikolaev, V.O., Ruth, P., Ehinger, R., Lukowski, R. (202x). *Kcnt1* encoded Na<sup>+</sup>-activated Slack K<sup>+</sup>-channels limit ischemia/reperfusion-induced cardiac injury and dysfunction. **(in Vorbereitung)**

Manke, M.-C., **Roslan, A.**, Walker, B., Münzert, P., Kollotzek, F., Peng, B., Mencl, S., Lieberman, A.P., Lang, F., Gawaz, M., Kleinschnitz, C., Lukowski, R., Ahrends, R., Bobe, R., Borst, O. (202x). *Niemann-Pick C1 protein regulates platelet membrane-associated Ca<sup>2+</sup> signaling in thrombo-occlusive diseases in mice.* **(in Vorbereitung)**

#### 2021

Bork, N. I., **Kuret, A.**, Cruz Santos, M., Molina, C. E., Reiter, B., Reichenspurner, H., Friebe, A., Skryabin, B. V., Rozhdestvensky, T. S., Kuhn, M., Lukowski, R., & Nikolaev, V. O. (2021). Rise of cGMP by partial phosphodiesterase-3A degradation enhances cardioprotection during hypoxia. *Redox Biol*, 48, 102179.

Ehinger, R., **Kuret, A.**, Matt, L., Frank, N., Wild, K., Kabagema-Bilan, C., Bischof, H., Malli, R., Ruth, P., Bausch, A. E., & Lukowski, R. (2021). Slack K(+) channels attenuate NMDA-induced excitotoxic brain damage and neuronal cell death. *FASEB J*, 35(5), e21568.

#### 2020

Adler, J., **Kuret, A.**, Langst, N., & Lukowski, R. (2020). Targets of cGMP/cGKI in Cardiac Myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 75(6), 494-507.

Beyer, T., Klose, F., **Kuret, A.**, Hoffmann, F., Lukowski, R., Ueffing, M., & Boldt, K. (2021). Tissue- and isoform-specific protein complex analysis with natively processed bait proteins. *J Proteomics*, 231, 103947.

#### 2018

Frankenreiter, S., Groneberg, D., **Kuret, A.**, Krieg, T., Ruth, P., Friebe, A., & Lukowski, R. (2018). Cardioprotection by ischemic postconditioning and cyclic guanosine monophosphate-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Cardiovasc Res*, 114(6), 822-829.

#### 2017

Straubinger, J., Boldt, K., **Kuret, A.**, Deng, L., Krattenmacher, D., Bork, N., Desch, M., Feil, R., Feil, S., Nemer, M., Ueffing, M., Ruth, P., Just, S., & Lukowski, R. (2017). Amplified pathogenic actions of angiotensin II in cysteine-rich LIM-only protein 4-negative mouse hearts. *FASEB J*, 1620-1638. **(im Rahmen des Masterstudiums entstanden)**

#### 2016

Lipp, H.-P.; Frank, N.; **Kuret, A.** (2016). EU(7)-PIM - eine europäische Screening-Liste zur Identifikation potentiell unangemessener Arzneimitteltherapien bei älteren Patienten. *Krankenhauspharmazie* 37. Jahrgang Nr. 12 2016 **(im Rahmen des Masterstudiums entstanden)**

## 8.2 Kongressbeiträge

**Anna Kuret**, Helmut Bischof, Sophia Schanz, Annika Luczak, Xiaobo Zhou, Roland Malli, Peter Ruth, Rebekka Ehinger und Robert Lukowski: "Kcnt1 encoded sodium-activated potassium channel Slack (aka Slo2.2 or KNa1.1) and its role in cardioprotection"; DPhG Annual Meeting 2021, Virtual Meeting, 10/2021 (*e-Poster*)

**Anna Kuret**, Rebekka Ehinger, Helmut Bischof, Annika Luczak, Julia Adler, Xiaobo Zhou, Roland Malli, Peter Ruth und Robert Lukowski: "Kcnt1 encoded sodium-activated potassium channels (aka Slack, Slo2.2 or KNa1.1) in ischemia/reperfusion-induced cardiac injury"; 6th German Pharm-Tox Summit (DGPT Jahrestagung 2021), Virtual Meeting, 03/2021 (*Vortrag*)

**Anna Kuret**, Rebekka Ehinger, Helmut Bischof, Annika Luczak, Anne Bausch, Xiaobo Zhou, Roland Malli, Peter Ruth und Robert Lukowski: "Cardioprotective actions of the sodium-activated potassium channel Slack (aka Slo2.2, KNa1.1 or KCNT1)"; ESC-Congress 2020 - The Digital Experience, Amsterdam, Niederlande, 08/2020 (*e-Poster*)

**Anna Kuret**: "Slack functions in myocardial I/R injury"; Meeting "Lessons learned from K<sub>Na</sub> 1.1-targeted mice", Tübingen, Deutschland, 05/2019 (*Vortrag*)

**Anna Kuret**: "Cardiac BK and Slack channels afford protection against ischemia and reperfusion injury", Meeting "K<sup>+</sup> Channel Functions and K<sup>+</sup> Dynamics"; Tübingen, Deutschland, 06/2018 (*Vortrag*)

Sandra Frankenreiter, **Anna Kuret**, Julia Straubinger, Thomas Krieg, Mike Murphy, Adam Szweczyk, Andreas Friebe, Peter Ruth und Robert Lukowski: "Cardiomyocyte NO-sensitive guanylyl cyclase and mitochondrial BK channels and their roles in myocardial ischemia /reperfusion injury"; Ion Channel Symposium, Kopenhagen, Dänemark, 05/2018 (*Poster*)

Sandra Frankenreiter, **Anna Kuret**, Dieter Groneberg, Peter Ruth, Andreas Friebe und Robert Lukowski: "Cardiomyocyte NO-sensitive guanylyl cyclase limits the extent of ischemia- and reperfusion-induced cardiac injury"; 3<sup>rd</sup> German Pharm-Tox Summit (DGPT Jahrestagung 2018), Göttingen, Deutschland 03/2018 (*Poster*)

**Anna Kuret**: "Role of sGC and IRAG in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice"; DFG FOR2060 PhD Retreat; Würzburg, Deutschland, 11/2017 (*Vortrag*)

**Anna Kuret**, Sandra Frankenreiter, Anne Bausch und Robert Lukowski: "Potassium channels such as BK, Slick and Slack against ischemia and reperfusion injury of the mouse heart"; e:Med Summer School "COME", Hamburg, Deutschland, 04/2017 (*Poster*)